

政策創薬総合研究事業  
政策創薬総合研究推進事業

平成18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

# 目 次

## 重点研究

### 課題番号

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
KA21503	HIV-1ディフェンスワクチンの創製・開発研究	梅田 衛 ……	22
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 ……	32
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 ……	45

## 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 ……	57
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 ……	71
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 ……	88
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 ……	103
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 ……	116
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 正顕 ……	122
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 ……	157
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 ……	174
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 ……	193
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 ……	206
SAC4861	HIV転写制御機構の解明と新規治療法の開発	岡本 尚 ……	216
SAC4862	霊長類モデルを用いたエイズ腸管病態形成機構の解明と治療への応用	三浦 智行 ……	221

## 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 クリプトスポリジア症・トキソプラズマ症・赤痢アメーバ症などエイズに伴う原虫性感染症に対する新規化学療法剤の創生を目的として、特異的代謝経路を標的とした多角的な創薬研究を行った。それぞれの原虫感染症に関しても、誘導体合成とインビトロ・インビボ薬効の検定は順調に進むとともに、抗クリプトスポリジア症・赤痢アメーバ症となる誘導体に関しては構造活性相関が確立され、今後の実用化に十分な成果が得られた。

### 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

クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、赤痢アメーバ症はHIV/AIDSに伴う重要な原虫性感染症である。これらの感染症はいずれも難治であったり、限定された治療法しか存在しないなど、治療法に問題があり、新規治療法の開発が求められている。これら原虫症の治療・予防上の問題点を挙げれば、赤痢アメーバ症に対しては、(1) メトロニダゾール治療抵抗性症例の出現、(2) メトロニダゾール無症候性キャリアに対する治療効果が不十分などの問題が挙げられる。また、トキソプラズマ症ではHIV/AIDSに伴い劇症の脳症を起こすが、この有効な治療法は存在しない。クリプトスポリジウムも免疫不全で劇症の下痢を誘起するが、同様に選択的で有効な化学療法剤は存在しない。したがってこれら原虫症に対する化学療法剤開発は国内外のHIV/AIDSのコントロールにとって重要な課題である。

本研究はこれら原虫性感染症に対する全く新しい治療・予防法を創出することを目的としている。標的酵素のタンパク質化学的解析から、化合物合成、インビトロ・インビボ薬効試験などを含めた包括的な創薬研究を遂行した。特に、通常困難を

極める創薬を実現するために、専門性を異にする寄生虫学研究者、化学合成を専門にする工学・薬学研究者、更に、薬剤開発・非臨床試験・臨床試験に豊富な経験をもつ企業の専門家の共同グループから構成される研究グループをつくり、開発研究を展開した。まず第1に、原虫に選択的に存在する代謝経路を狙い、特異的酵素のX線結晶構造解析からラショナルな創薬デザインを可能にする研究を行った。第2に、酵素の立体構造を基礎とした化学合成を行い、多くの候補誘導体を合成した。第3に、これら多くの誘導体の中からインビトロ・インビボ試験を通じて最も有効な薬剤候補を選択することができた。

本研究班では原虫ごとに北、浅井、中野・野崎が3つの研究テーマに分かれて創薬研究を展開したが、山本が化合物の合成を中心とした基盤的援助を行ったことがその成功の鍵となった。山本の役割は極めて重要であり、化学合成の専門家と生物学・感染症学の専門家とのパイプ役という重要な役割を果たした。

### B. 研究方法

#### a. 抗原虫薬誘導体の合成

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山本により昨年と同様の方法で合成された。抗トキソプラズマ創薬では更に、以下の新規ピリジン化合物を合成した。

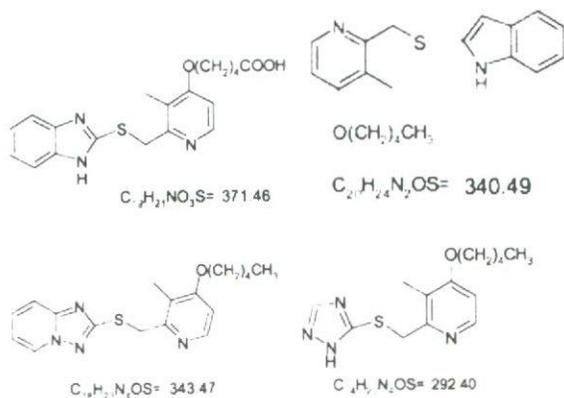


図1 新規合成された抗トキソプラズマピリジン化合物

抗赤痢アメーバ薬剤として開発中のトリフルオロメチオニン誘導体に関しては、以下に示す第3-4世代の誘導体を合成した。合成は名古屋工業大学の融・柴田博士に依頼した。合成法の詳細は山本の分担研究報告書に詳述されている。アスコフラノン誘導体は昨年度と同様の方法により、北・鳥取大学工学部の齋本博之博士により合成された。

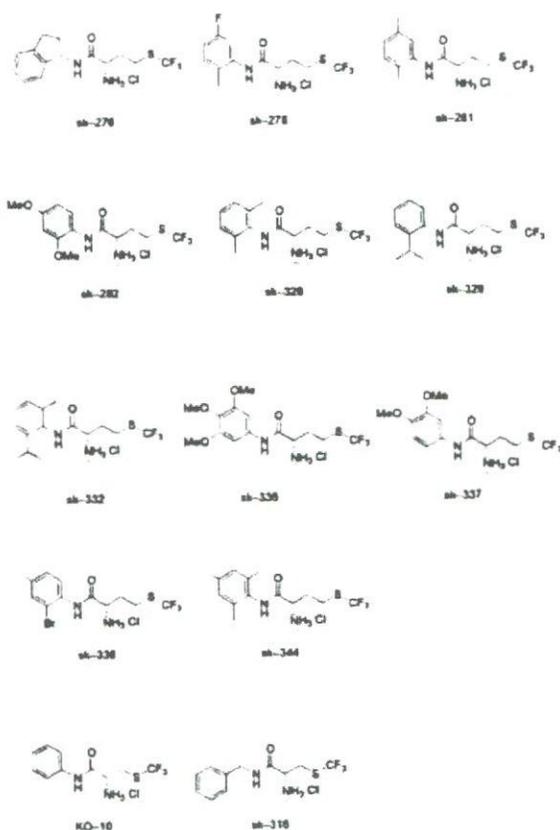
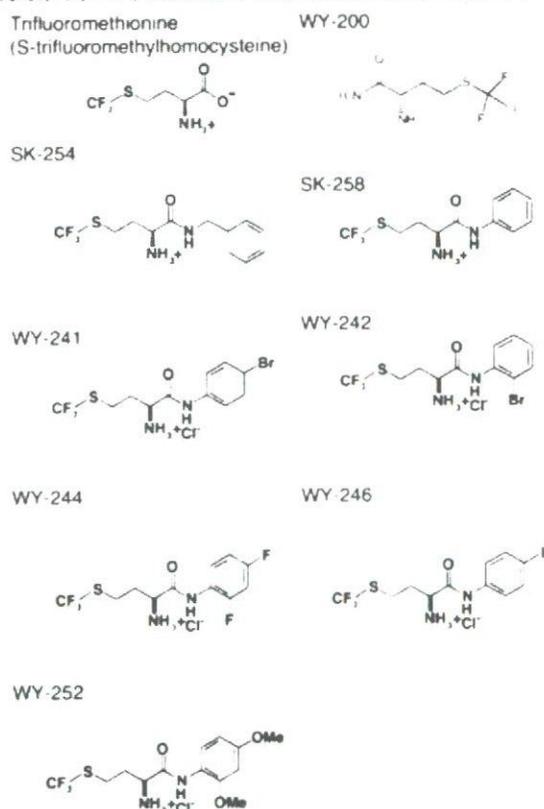


図2 本年度合成された抗赤痢アメーバトリフルオロメチオニン誘導体

b. クリプトスポリジウム末端酸化酵素(CpAOX)の大腸菌発現系の確立とアスコフラノン誘導体によるキノール酸化酵素の阻害

昨年度報告した組換え CpAOX の発現系は一定の再現性はあるもののまだ不完全なものであった。そこでさらに諸条件を検討し、培養・発現誘導・細胞破碎・精製の方法論を確立した。詳細は北の分担研究報告書に記載されている。キノール酸化酵素活性の測定法、並びに阻害試験は分担研究報告書に記載されている通りである。

c. クリプトスポリジウム末端酸化酵素(CpAOX)の抗体作製とオーシストにおける発現確認

組換え CpAOX を大腸菌膜画分から sodium N-lauroyl sarcosinate (サルコシル) で可溶化し、His タグを用いて精製した抗原、および SDS-PAGE のゲルから切り出されたタンパク質を抗原としてウサギを免疫し、抗体を作製した。オーシストの回収と SDS-PAGE、イムノプロットは常法に従った。

d. 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼ (MGL1・MGL2)の合成と酵素活性の測定

赤痢アメーバ MGL1・MGL2 組換えタンパク質の合成、並びに酵素アッセイは昨年度の報告書に詳述された方法により行った。

e. トキソプラズマのインビボ薬剤の評価

5週齢の ICR マウス雌、高病原性 RH 株と中程度の感染性を示す ME49 株を用いた。ME49 株はタキゾイト型を得るのが困難なため、脳より Cyst を回収して感染実験に用いた。対照群と薬剤の実験群にはそれぞれ 10 匹のマウスを用いた。RH 株タキゾイト型虫体は一匹あたり  $1 \times 10^3$  個体、ME49 株は 10 個の Cyst を腹腔内に投与して感染させた。

薬剤は Cremophor EL に溶解し投与した。RH、ME49 株投与群はその後のマウスの生死を観察した。その後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。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破壊し、顕微鏡下で脳組織破壊液 0.1 ml 中の Cyst 数を計測した。

f. 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ビトロ・インビボ評価

インビトロでの薬効評価は BI-S-33 培地を用いた培養系で昨年の報告書に記述された方法で行った。それぞれの化合物を共存下で、48-72 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。インビボの薬効評価はシリアンゴールドンハムスターの肝膿瘍モデルを用いて行った。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、6 日後に開腹、膿瘍の重量の測定を行い治療効果を判定した。薬剤投与は腹腔内投与で行った。

g. 赤痢アメーバ MGL の構造の解明

蒸気拡散法にて結晶化を行った。至適条件検討は Crystal Screen (Hampton Research)を用いて sparse-matrix sampling 法にて初-2 年度とほぼ同様の方法で行った。酵素の結晶化後に基質溶液中で短時間のソーキングを行い、基質であるメチオニン、システイン、ホモシステイン、O アセチ

ルセリン、トリフルオロメチオニンとの共結晶を作製した。結晶を液体窒素で凍結した後、播磨理化学研究所 SPring8 の BL44XU を用いて、X 線回折像を得た。データは Imaging Plate detector (DIP6040)で検出し、HKL2000 で解析を行った。

C. 研究結果

a. クリプトスポリジウムのシアン耐性末端酸化酵素を用いたアスコフラノン誘導体の構造活性相関の確立

これまでの結果より、アスコフラノンは CpAOX、ChAOX とともに極めて低濃度で酵素活性を阻害し、 $IC_{50}$  値は約 1 nM であり、既存の AOX 阻害剤である SHAM に比べ、数千分の 1 の濃度であった。この事はアスコフラノンが抗クリプトスポリジウム薬として非常に有望である事を示している。今年度の実験から、芳香環部分が阻害作用に最も重要な役割を果たしている事が明らかになった。さらに、不斉炭素を含むフラノン環を除いても nM オーダーの  $IC_{50}$  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少ない合成ステップで安価に合成する事が可能であることが判った。また、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ことが明らかになった。

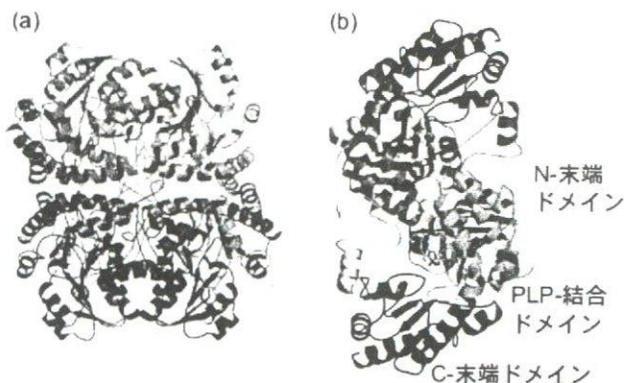
Compound			
	Ascofuranone (AF)	1.0 nM	
	Asochlorin	80 nM	
	R <sub>1</sub> =C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	200-9	4.5 nM
	R <sub>1</sub> =C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	200-10	5.5 nM
	R <sub>1</sub> =C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	200-12	8.0 nM
	R <sub>2</sub> =C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	196-9	4.9 nM
	R <sub>2</sub> =C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	196-12	6.5 nM
	R <sub>3</sub> =C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	195-9	2.7 μM
	R <sub>3</sub> =C <sub>11</sub> H <sub>23</sub>	195-12	2.9 μM
		198-12	2.0 μM
		197-10	18 μM

表1 アスコフラノン誘導体の AOX に対する  $IC_{50}$

## b. 赤痢アメーバ MGL の結晶構造の解明

MGL を標的とした創薬を達成するためには高次構造の決定は不可欠である。高い解像度を得るために結晶化条件の改良を行った結果、結晶は大きくなり、解像度を 1.8Å、R factor 0.183 まで向上させることができた。共結晶は 4 種類の阻害剤・基質（プロパジルグリシン、アミノエトキシビニルグリシン、トリフルオロアラニン、メチオニン）を用いて作製することができた。

MGL2 は単一の 4 量体であり、それぞれ PLP が一分子ずつ結合している。単量体は 3 つのドメインからなり、N 末端領域(1-58 aa)は長いループ構造で結ばれた  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ヘリックスからなる。中央の PLP 結合ドメイン(59-258 aa)は 7 本のストランドからなる  $\beta$  シートを含み側面を 8 本の  $\alpha$  ヘリックスに囲まれている。C 末端ドメイン(259-392 aa)は 5 本のストランドからなる  $\beta$  シートとその両側に位置する 5 本の  $\alpha$  ヘリックスから構成されている。



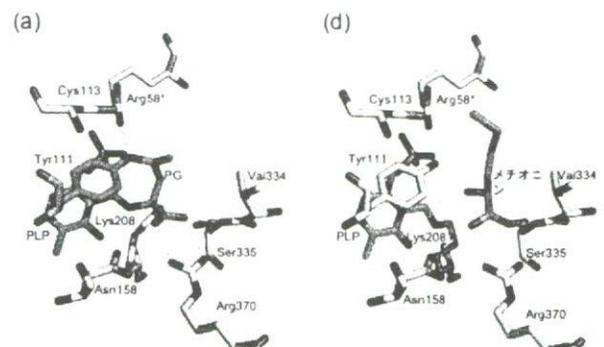
(a) 活性ダイマーの二量体として、222対称で関係付けられたホモテトラマーとなっている。モノマーをそれぞれ、緑、黄、赤、青で表した。(b) EhMGL2の活性ダイマー。2つのモノマーが二回回転軸で関係付けられている。モノマーのN-末端ドメイン、PLP結合ドメイン、C-末端ドメインをそれぞれ、緑、シアン、青で表した。PLPをスティックモデルで表した。

図3 赤痢アメーバ MGL2 の 4 量体構造

共結晶に用いた前 3 者の阻害剤のうち、プロパジルグリシンで 1.95 Å というもっとも優れた解像度が得られた。アミノエトキシビニルグリシン、トリフルオロアラニンでは 2.6、2.1 Å の解像度が得られた。詳細はプロパジルグリシンとの共結晶に関してのみ記述する。プロパジルグリシンは

各サブユニットに 1 分子ずつ結合していた。PLP は少し傾いていたが ( $<10^\circ$ )、リン酸基は固定化されたままであった。Tyr111 も PLP のピリミジン環と並行になるように少し傾き、PG の  $\gamma$ -炭素と共有結合していた。プロパジルグリシンのカルボキシル基は Arg370 のグアニジニウム基と 2 本のイオン性水素結合を形成することで安定化されていた。C 末端領域の  $\alpha 14$ -ループ- $\alpha 15$  (His345-Leu364) が活性中心を蔽っている領域に動きがみられた。

本来の基質であるメチオニンとの複合結晶は、共結晶法ではなく、MGL2 の結晶を 60 秒 50mM メチオニンを含む溶液に浸すことにより得られた。分解能は 2.0 Å であった。メチオニンのアミノ基の N 原子から Tyr111 のヒドロキシル基の O 原子までの距離は 2.5~2.9 Å、PLP-Lys208 シッフ塩基の C 原子までの距離は 2.8~3.2 Å であった (図 4)。メチオニンのアミノ基が Tyr111 のヒドロキシル基にプロトンを引き抜かれて活性化されるどころだと考えられる。メチオニンのカルボキシル基は Arg370 のグアニジニウム基、Asn158 の側鎖 NH<sub>2</sub> 基、Ser335 の主鎖 NH と水素結合している。プロパジルグリシン複合体のような C 末端領域の動きは起きていなかった。



重要な相互作用はドット線で示した。活性ダイマーを形成している隣接するモノマーのアミノ酸残基を\*印で示した。(a) PLP-PG-Tyr111複合体を緑で表した。(d) PLPとメチオニンを緑で表した。

図4 赤痢アメーバ MGL2 の活性中心の構造 (a) プロパジルグリシン(PG)との共結晶、(b)メチオニンとの共結晶

c. 赤痢アメーバに対するトリフルオロメチオニン誘導体の構造活性相関の確立

インビトロ培養系での新規トリフルオロメチオニン誘導体の抗原虫作用を 48 時間後の増殖に対する IC<sub>50</sub> で示す。表 1 に示されない化合物(WY242; WY246; SK278; SK281; SK328; SK329; SK332; SK338; SK344)は 20 $\mu$ M で効果を示さなかった。

化合物	IC <sub>50</sub>
TFM	17.2
SK254	2.5
SK258	2.5
WY241	11.8
WY244	5.5
WY252	1.6
KO10	13.7
SK276	6.8
SK316	8.9
SK336	1.7
SK337	1.5

表 2 新規トリフルオロメチオニン誘導体のインビトロ増殖阻害 (単位  $\mu$ M)

最終年度に合成された新規化合物のうち SK254, SK258, WY244, WY252, SK276, SK336 及び SK337 はトリフルオロメチオニンよりも 2-11 倍低い IC<sub>50</sub> を示した。これらの化合物は、2 年度に合成されたトリフルオロメチオニンのアミド誘導体(WY200)を基本骨格としている。SK254 及び SK258 は WY200 のアミド基に更にベンジル基あるいはフェニル基が付加したものである。更に、WY244, WY252 では SK258 のフェニル基の 2, 4 位にそれぞれフッ素或はメトキシ基が付加されている。一方、SK336 と SK337 は SK258 のフェニル基の 3, 4-ジ、および 3, 4, 5-トリのメトキシ置換体である。SK276 は WY200 にインデン基(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>-)が付加されている。WY241 は SK258 の 4 プロモ置換体である。KO10 と SK316 はそれぞれ SK258 と SK254 と似た化合物であるが、出発化合物がトリフルオロメチルホモステインではなく、トリフルオロメチルシステインであり炭素長が一つ短い。SK278, SK281, SK328, SK329, SK332, SK338, SK344 は SK258 のフェニル基に 1, 3 位や 1, 3, 5 位にアルキル基やハロゲンの置換が入った化合物である。

昨年までの結果により、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高いインビトロの薬効をもつことを示した。本年度の結果から更に、WY200 のアミドに官能基を付加することによりそれ以上の薬効が得られることが明らかとなった。脂溶性の高いフェニル基、ベンジル基、インデン基で 2.5-6.8 $\mu$ M の IC<sub>50</sub> を示した。

フェニル基の 2 位あるいは 4 位にプロモ位の 1 置換が入った WY241, WY242, WY246 では薬効が減少したが、2, 4 位の 2 カ所にフロロあるいはメトキシ置換の入った WY244, WY252 では薬効の軽度向上あるいは維持が見られた。更に、3, 4 位や 3, 4, 5 位にメトキシ置換が入った SK336 や SK337 でもが、薬効は向上した。

以上のことより、トリフルオロメチオニンのアミド置換体の薬効は本年度の脂溶性側鎖の付加により更に数倍向上した。更にフェニル基に複数の側鎖を付加することにより、トリフルオロメチオニンの 10 倍を超える薬効を示す誘導体を作製することができた。

#### d. アメーバ肝膿瘍モデルの治療効果の評価

新規トリフルオロメチオニン誘導体の治療効果をハムスター肝膿瘍モデルで評価した。各群 A-C の 3 頭の動物で行ったが、以下に示す誘導体にトリフルオロメチオニンと同等、あるいはそれ以上の治療効果が見られた。

	肝総重量=肝非膿瘍+肝膿瘍部分 (mg)		
Control (治療せず):			
A.	3,679	2,863	816
B.	4,701	2,871	1,830
C.	3,511	2,570	941
トリフルオロメチオニン:			
A.	2,240	2,240	-
B.	2,415	2,415	-
C.	2,575	2,575	-
WY200:			
A.	3,059	3,059	-
B.	1,624	1,624	-
SK254:			
A.	2,318	2,318	-

B.	2,193	2,193	-
C.	2,386	2,386	-
SK258:			
A.	2,071	2,071	-
B.	2,768	2,768	-
C.	1,510	1,510	-
WY241:			
A.	2,916	2,916	-
B.	2,371	2,371	-
C.	2,900	2,900	-
WY244:			
A.	2,575	2,561	14
B.	2,181	2,181	-
C.	2,570	2,570	-
WY252:			
A.	2,539	2,120	19
B.	3,338	3,338	-
C.	2,687	2,687	-

表3 トリフルオロメチオニン誘導体のハムスター肝臓瘍治療効果

#### e. NTPase 阻害剤の動物投与実験

強毒株である RH が投与された群には、原虫感染後6時間目より薬剤の投与を行い、その後合計3回の薬剤投与を行った。これ以上の薬剤投与は未感染動物での実験で、副作用と思われる体毛の異常が感じられたので断念した。対照群は10日目までに全個体が死滅した。原虫感染個体数を減少させると死亡する日数が伸びるが、ばらつきが大きく結局  $1 \times 10^3$  個体の原虫投与が再現性の良い結果が得られた。ピリメサミン投与群は多少の延命が確認された。2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole 投与群は対照に比べて早めに死亡する個体が多く、薬剤としての効果は全く認められなかった。

ME49 株感染群ではタキゾイト虫体が体内に現れる6日目から3日間連続で薬剤投与を行った。薬剤投与後の脳内 Cyst 数は図5にまとめられている。2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole 単独投与群では約半数の Cyst 数の減少が確認された。ピリメサミン単独投与群、ピリメサミンと 2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole 混合投与群では約1/6までの Cyst 数の減少が確認された。

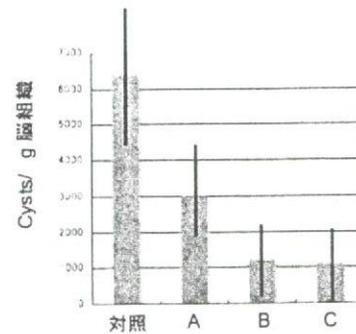


図5 ME49 株感染マウス（対照群および薬剤投与群）の脳内シスト数

平均値 ± 標準偏差値を示す。A: 2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole, B:ピリメサミン, C:2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole + ピリメサミン

#### D. 考察

本研究班ではエイズに伴う原虫性感染症、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。最終年度は、トキソプラズマ症に対する創薬では、浅井が NTPase の結晶構造の解明、NTPase 阻害剤のインビボ試験を目標に研究展開した。クリプトスポリジア症に対する創薬に関しては、北が AOX を標的酵素として、阻害剤アスコフラノン誘導体の構造活性相関の確立、AOX の細胞内局在の解明の2点を主眼に研究を進めた。野崎・中野が行う赤痢アメーバ症に対する創薬では、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の誘導体合成、構造活性相関の確立、インビボ試験を実施した。

クリプトスポリジア症創薬における最終年度の成果の一つは、*C. parvum* AOX を用いてアスコフラノン誘導体の構造活性相関を確立したことであった。アスコフラノンの  $IC_{50}$  値は約 1 nM であり、既存の AOX 阻害剤である SHAM に比べ、数千分の1の濃度であった。このことはアスコフラノンが抗クリプトスポリジウム薬として非常に有望であることを示している。今年度の実験から、芳香

環部分、特にクロロ基とメチル基が阻害作用に最も重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、不斉炭素を含むフラノン環を除いても nM オーダーの IC<sub>50</sub> 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少ない合成ステップで安価に合成する事が可能であることが明らかとなった。これは合成過程を今後最適化する上で極めて重要な発見であった。更に今年度、局在・機能解析に有用な AOX 抗血清を獲得できたことにより、ミトコンドリア局在など、クリプトスポリジウム AOX の機能解明に繋がる研究基盤が整備されたと言える。

一方、トキソプラズマ症に対する創薬研究では、結晶構造解析、インビボ試験いずれの分野でも、1-2年度と比較すると、研究の進展にやや時間を要した。結晶構造解析においては、精製された NTPase に電氣的に微細な不均一性が存在すると考えられた。阻害剤である 2-Phenylthio-indole を用いた X 線回折も、分解能が 8 オングストロームと活性中心の構造の解明には繋がらなかった。今後、結晶化条件、ソーキング法の至適化が必要である。インビボ試験でも様々な問題点が明らかとなった。2-Phenylthio-indole のインビボ試験の結果は不満足なものであった。強毒株を用いた感染実験では NTPase 阻害剤だけでなく、臨床治療薬としても用いられているピリメサミンでも、有効性を認められなかったことより、急性トキソプラズマ症のモデルとしては現状のマウスモデルは不完全であることが明らかとなった。しかしながら、Cyst を作る ME49 株を用いた慢性・亜急性モデルでは、2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole 治療により、脳 Cyst 数の減少に効果が認められた。しかしピリメサミン投与に対する相加・相乗効果は全く認められなかった。今後投与経路、容量、DDS 構築などによって薬効を向上させることが必要であるが、本研究成果は本リード化合物が慢性・亜急性のトキソプラズマ症の治療に使用出来る可能性を示唆している。

赤痢アメーバ症創薬においてもいくつかの重要な成果を挙げた。第一に、リード化合物トリフルオロメチオニンのもとに作製された第 2、第 3 世代の誘導体のインビトロ・インビボでの効果を確認し、トリフルオロメチオニンを越える効果を有

する誘導体を明らかにした。第 1 世代のトリフルオロメチオニンのアミド誘導体(WY200)をもとに、そのアミド基にフェニル基あるいはベンジル基を付加した第 2 世代、更にフェニル基に置換を入れた第 3 世代の誘導体の一部はトリフルオロメチオニン及びアミド化合物(WY200)を超える優れた薬効を示した。更に、多くの誘導体のインビトロ原虫殺滅効果を検証することで、トリフルオロメチオニン誘導体の構造とインビトロ抗原虫活性の相関が得られた。第 2 の成果はトリフルオロメチオニンの細胞内での標的が MGL の 2 種類のアイソタイプのうち MGL2 であることを組換え酵素を用いて示したことである。更に興味深い点は、MGL 組換え酵素を用いた評価では、トリフルオロメチオニンよりインビトロの抗原虫効果の高い薬剤は、決してトリフルオロメチオニンより分解され易い化合物ではなかった。このことはこれらアミドを基本骨格とした誘導体が優れた薬効を示すのは培養液中での安定性、細胞膜の透過性、細胞質への取り込み、細胞内での安定性などの要因による可能性があることを示唆している。第 3 の成果は、トリフルオロメチオニンの主な標的である MGL2 の結晶構造が明らかにされたことである。生理的基質であるメチオニンと 3 種類の阻害剤との複合結晶の構造が解像度 2Å 程度で得られた。この結果、活性ポケットにはまる基質、阻害剤の様子を詳細に理解することが出来た。今後の論理的創薬が飛躍的に進展すると期待される。現在我々はインビトロ・インビボでの有効性に優れたトリフルオロメチオニンの誘導体、特にアミド化誘導体、アニリド化誘導体、メトキシアニリド誘導体と MGL2 との複合結晶を作製し、その結晶構造を解明することを次の到達点として研究を継続中である。

## E. 結論

最終年度の研究成果により、クリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、赤痢アメーバ症に対する創薬は、新規化合物の合成、標的酵素の構造の解明、作用機序の理解など様々な方向から有機的に繋がりが合い、十分な成果を収めることができた。研究グループの立ち上げに際して特に重視したのは、医学・薬学研究と化学・合成研究との連携で

あった。化学合成を専門とする研究者と新薬開発のエキスパートである製薬企業と連携することにより、原虫研究専門家だけで構成されたこれまでの創薬研究の問題を払拭し、具体的な創薬に漕ぎ着けることができたと確信している。今後は物性・安全性試験などに代表される非臨床試験を導入し、アスコフラノン、トリフルオロメチオニン誘導体を抗赤痢アメーバ薬剤として確立したい。なお、本報告書に記載された化合物は既に国内、並びに、国際 PCT 出願を終了している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Asai T and Tomavo S. Biochemistry and Metabolism of *Toxoplasma gondii* (page185-206) *Toxoplasma gondii*. The Model Apicomplexan-Perspective and Method (Weiss and Kim eds) Elsevier Science (2006)
2. Saito T, Maeda T, Nishi M, Hashimoto H, Wu B, Roos DS, Takeuchi T, Asai T. A novel GDP-dependent pyruvate kinase isozyme from *Toxoplasma gondii* is targeted to both the mitochondrion and the apicoplast. *J. Biol. Chem.* 2007 (in press)
3. Sariego, 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
4. Nishida, S., Kurokawa, K., Matsuo, M., Sakamoto, K., Ueno, K., Kita, K. and Sekimizu, K. (2006) Identification and characterization of amino acid residues essential for the active site of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB) from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 281, 1714-1724
5. Shinjyo, N. and Kita, K. (2006) Up-regulation of Heme Biosynthesis during Neuronal Differentiation. *J. Biochem.* 139, 373-381
6. Mi-ichi, F., Kita, K. and Mitamura, T. (2006) Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilize a broad range of serum-derived fatty acids with limited modification for their growth. *Parasitology*, 133, 399-410
7. Ui, H., Shiomi, K., Suzuki, H., Hatano, H., Morimoto, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Sunazuka, T., Shimamura, H., Sakamoto, K., Kita, K., Miyoshi, H., Tomoda, H., and Omura, S. (2006) Verticipyronone, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Verticillium* sp. FKI-1083. *J. Antibiot.* 59, 785-790
8. Miura, S., Tomitsuka, E., Kamei, Y., Yamazaki, T., Kai, Y., Tamura, M., Kita, K., Nishino, I., and Ezaki, O. (2006) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator -1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) Develops Muscle Atrophy with Depletion of ATP. *Am. J. Physiol.* 169, 1129-1139
9. Arita, M., Suematsu, T., Osanai, A., Inaba, T., Kamiya, H., aruo; Kita, K., Sisido, M., Watanabe, Y., and Ohtsuki, T. (2006) An evolutionary "intermediate state" of mitochondrial translation systems found in *Trichinella* species of parasitic nematodes: Co-evolution of tRNA and EF-Tu. *Nuc. Acid. Res.* 34, 5291-5299
10. Ui, H., Shiomi, K., Suzuki, H., Hatano, H., Morimoto, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Sakamoto, K., Kita, K., Miyoshi, H., Tomoda, H., Tanaka, H., Omura, S. (2006) Paecilaminol, a New NADH-Fumarate Reductase Inhibitor, Produced by *Paecilomyces* sp. FKI-0550. *J. Antibiot.* 59, 591-596
11. Kobayashi T., Sato, S., Takamiya, S., Komaki-Yasuda, K., Yano, K., Hirata, A., Onitsuka, I., Hata, M., Mi-ichi, F., Tanaka, T., Hase, T., Miyajima, A., Kawazu, S., Watanabe, Y., Kita, K. (2007) Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*:

- behaviour on subcellular fractionation and the implication. *Mitochondrion* 7, 125-132
12. Mita, T., Tanabe, K., Takahashi, N., Tsukahara, T., Eto, H., Dyssoley, L., Ohmae, H., Kita, K., Krudsood, S., Looareesuwan, S., Kaneko, A., Bjokman, A., and Kobayakawa, T. (2007) Independent evolution of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Melanesia. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51, 1071-1077
  13. Kimata-Arigo, Y., Kurisu, G., Kusunoki, M., Aoki, S., Sato, D., Kobayashi T., Kita, K., Horii, T., and Hase, T. Cloning and characterization of ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from human malaria parasite. *J. Biochem.* in press
  14. Kita, K., Shiomi K., and Omura, S. (2007) Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitol.* in press
  15. Gilchrist, C. A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., Evans, C., Martino-Catt, S., Baba, D. J., Stroup, S., Hamano, S., Ehrenkauf, G., Okada, M., Singh, U., Nozaki, T., Mann, B. J., Petri, Jr., W. (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 147, 163-176.
  16. Mitra, B. N., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y., and Nozaki, T. (2006) *Entamoeba histolytica*: Differences in phagosome acidification and degradation between attenuated and virulent strains. *Exp. Parasitol.* 114, 57-61.
  17. Sato, D., Nakada-Tsukui, K., Okada, M., and Nozaki, T. (2006) Two cysteine protease inhibitors, EhICP1 and 2, localized in distinct compartments, negatively regulate secretion in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett.* 580, 5306-5312.
  18. Sato, D., Yamagata, W., Kamei, K., Nozaki, T. and Harada, S. (2006) Expression, purification, and crystallization of L-methionine  $\gamma$ -lyase 2 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62, 1034-1036.
  19. Ali, V. and Nozaki, T. (2007) Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing amino acid metabolism as a novel target against infections by 'amitochondriate' protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 164-187.
  20. Saito-Nakano, Y., Mitra, B. N., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and Nozaki, T. (2007) Two Rab7 isoforms, EhRab7A and EhRab7B, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* in press.
  21. Mitra, B. N., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., and Nozaki, T. (2007) Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* in press.
  22. Clark, C.G., Cecilia, U., Alsmark, M., Hofer, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Samuelson, J., Noel, C. J., Hirt, R. P., Embley, T. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., Singh, U., Ackers, J. P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillen, N., Duchene, M., Nozaki, T., and Hall, N. (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Adv. Parasitol.* in press.
2. 学会発表
1. 原田倫世、藤本陽子、中村公亮、城戸康年、坂元君年、八木欣平、所正治、北瀬、*Cryptosporidium* シアン耐性酸化酵素 (AOX) の解析 第75回日本寄生虫学会総

会 平成18年5月

2. 冨塚 江利子、宮寺 浩子、江角 浩安、北 潔、  
抗蟻虫薬 Pyrvinium Pamoate の寄生虫およびガン細胞を含む哺乳類ミトコンドリアにおける嫌氣的呼吸に対する阻害機構 第75回日本寄生虫学会総会 平成18年5月
3. 藪 義貞、鈴木高史、齋本博之、坂元君年、皆川信子、細川知良、永井和夫、北 潔、太田伸生、  
抗生物質アスコフラノンのクリプトスポリデウム症治療効果 第75回日本寄生虫学会総会 平成18年5月
4. Y. Kido, K. Sakamoto, K. Nakamura, Y. Fujimoto, M. Harada, Y. Yabu, T. Suzuki, K. Kita. Purification of recombinant trypanosome alternative oxidase (rTAO) ICPOA XI (国際寄生虫学会) 平成18年9月、グラスゴー
5. 齊藤智也、前田卓哉、竹内 勤、浅井隆志、トキソプラズマと熱帯熱マラリア原虫に見出された解糖経路上に位置しない新規のピルビン酸キナーゼ反応酵素、第75回日本寄生虫学会大会、2006.5、弘前。
6. 浅井隆志、齊藤智也、前田卓哉、竹内 勤、トキソプラズマの糖代謝調節機構、第5回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2006.10、東京。
7. 浅井隆志、David Sibley、竹内 勤、トキソプラズマ感染マウスにおける NTPase 阻害剤 {2-(1-Naphthalenylthio) 1-H-indol} の投与効果、第76回日本寄生虫学会大会、2007.3、大阪。
8. 中野由美子 (2006) 赤痢アメーバの生育に必要なコレステロールの細胞内動態、第75回日本寄生虫学会大会 2006年5月19-20日、弘前。
9. 仲本賢太郎、坪井敬文、所正治、野崎智義 (2006) 赤痢アメーバにおける S-adenosyl-L-methionine synthase および S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase の解析 第75回日本寄生虫学会大会 2006年5月19-20日、弘前。
10. 佐藤暖、岡田麻美、津久井久美子、野崎智義 (2006) 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(ICP)の機能解析 第75回日本寄生虫学会大会 2006年5月19-20日、弘前。
11. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Gilchrist, C. A., Petri Jr, W. A., Nozaki, T. (2006) Membrane traffic pathways associated with virulence in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Jun 18-23, 2006, Kyoto.
12. Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. (2006) Phagocytosis and phagosome maturation are regulated by PtdIns 3-phosphate-mediated signaling in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Jun 18-23, 2006, Kyoto.
13. Ali, V. and Nozaki, T. (2006) Iron sulfur (Fe-S) cluster assembly in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*: localization, oxygen sensitivity, and physiological significance. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress Jun 18-23, 2006, Kyoto.
14. 佐藤 暖、野崎智義 (2006) 赤痢アメーバ原虫のメチオニン $\gamma$ -リアーゼ-創薬リード化合物トリフルオロメチオニンの作用機序について、第14回分子寄生虫学ワークショップ、平成18年7月25日-28日草津、群馬。
15. 山形渉、佐藤 暖、野崎智義、原田繁春 (2006) 赤痢アメーバ原虫 *Entamoeba histolytica* 由来メチオニン $\gamma$ -リアーゼの結晶構造解析、第14回分子寄生虫学ワークショップ、平成18年7月25日-28日草津、群馬。
16. 津久井久美子、野崎智義 (2006) 腸管寄生原虫赤痢アメーバのファゴソーム形成・成熟時の膜輸送に関するフォスファチジルイノシトール3リン酸、第14回分子寄生虫学ワー

- クショッブ, 平成 18 年 7 月 25 日-28 日草津, 群馬.
17. 野崎智義 (2006) 嫌気性原虫のミトコンドリア, 第 14 回分子寄生虫学ワークショップ, 平成 18 年 7 月 25 日-28 日草津, 群馬.
  18. Ali, V. and Nozaki, T. (2006) Cysteine biosynthesis pathway in *Entamoeba histolytica* is a rational target to develop new chemotherapeutics against amebiasis. The 6th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept 4-7, 2006, Awaji, Hyogo, Japan.
  19. 中野由美子, Biswa Nath Mitra, 津久井久美子, 野崎智義 (2006) 赤痢アメーバにおけるメンブレントラフィックの多様性と特殊性 第 5 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005 年 10 月 28-29 日, 東京.
  20. 津久井久美子, 野崎智義 (2006) 赤痢アメーバの食食に関するフォスファチジルイノシトール 3 リン酸 第 5 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005 年 10 月 28-29 日, 東京.
  21. 佐藤暖, 津久井久美子, 野崎智義 (2006) 赤痢アメーバの原虫のシステインプロテアーゼ阻害タンパク質はシステインプロテアーゼの輸送・分泌を制御する分子である 第 5 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005 年 10 月 28-29 日, 東京.
  22. Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2006) Cross-correlation between autophagy and encystation in *Entamoeba invadens*. Forum Cheju-12: The 12th Korea-Japan Parasitologist's Seminar, Nov 5-7, 2006, Tokyo.
  23. Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. (2006) Phosphatidylinositide 3-phosphate mediates phagocytosis and phagosome maturation in protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 46th Annual meeting of the American Society for Cell Biology, Dec 9-13, 2006, San Diego, CA, U.S.A..
  24. Ali, V. and Nozaki, T. (2007) Regulation and physiological importance of sulfur-containing amino acid metabolism in *Entamoeba histolytica*. 41st Joint Conference on Parasitic Diseases of The Japa-United States Cooperative Medical Science Program, Feb 1-3, 2007, Tokyo.
  25. 中野由美子, 野崎智義 (2007) 赤痢アメーバの病原性におけるコレステロールの役割, 第 76 回日本寄生虫学会大会 2007 年 3 月 29-30 日, 大阪.
  26. 佐藤 暖, 山形渉, 所 正治, 原田繁春, 野崎智義 (2007) 抗赤痢アメーバ薬のリード化合物・トリフルオロメチオニンの作用機序の解明, 第 76 回日本寄生虫学会大会 2007 年 3 月 29-30 日, 大阪.
  27. 津久井久美子, 野崎智義 (2007) 腸管寄生性原虫赤痢アメーバの食食にユニークな分子機構とフォスファチジルイノシトール 3 リン酸シグナル, 第 76 回日本寄生虫学会大会 2007 年 3 月 29-30 日, 大阪.
  28. 仲本賢太郎, 所正治, 野崎智義 (2007) Characterization of S-adenosyl-L-methionine synthase from *Entamoeba histolytica*: Expression analysis of native enzyme in trophozoites, 第 76 回日本寄生虫学会大会 2007 年 3 月 29-30 日, 大阪.
- 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, 外国 PCT/JP2006/326067 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18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19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