

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

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

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

エイズ医薬品等開発研究

重点研究報告書

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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 エイズに伴う原虫性感染症である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。候補薬剤の合成法の確立、標的酵素の構造の解明、構造活性相関の解明などの基盤的な成果を生むとともに、誘導体のインビトロ・インビボ薬効の検定を終了し、実用化に繋がる十分な成果を得た。

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。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た。

赤痢アメーバ症の治療・予防上の問題点としては、(1) メトロニダゾール治療抵抗性症例の出現、(2) メトロニダゾールの無症候性キャリアに対する不十分な治療効果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。

本研究ではこれら原虫性感染症に対する新規化学療法剤を開発することを目的として、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化学・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構造活性相関を確立し、将来の合理的創薬デザインを可能とした。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した。

B. 研究方法

a. 抗原虫薬誘導体の合成

抗クリプトスポリジウム薬剤としては末端酸化酵素(AOX)の阻害剤であるアスコフラノン(Ascofuranone)をリード化合物として誘導体化を行った。アスコフラノンの芳香環部分の官能基(メチル基、クロル基)、フラノン環の有無、リンカー部分などを変化させた>100の化合物を合成した。抗トキソプラズマ薬剤としてはヌクレオシド3リン酸加水分解酵素(NTPase)の阻害剤であるフェニルチオインドールとナフタレンチオインドール、更にベンズニダゾールとピリジン骨格を有する新規化合物群を合成した。抗赤痢アメーバ薬剤としてはメチオニンガンマリナーゼ(MGL)のプロドラッグであるトリフルオロメチオニン(TFM)のカルボン酸などにアミド等修飾を加え、30程度の誘導体を作製した。これら化合物は山本により、鳥取大学の齋本博士、名古屋工業大学の融・柴田博士の協力により合成された。

b. クリプトスポリジウム *Cryptosporidium parvum* (Cp)AOX・*C. hominis* ChAOX トキソプラズマ *Toxoplasma gondii* (Tg)NTPase・*Neospora caninum* (Nc)NTPase、ピルビン酸キナーゼ(PKII)、赤痢アメーバ MGL の大腸菌発現系の確立と組換えタンパク質の合成

ネイティブタンパク質、ヒスチジンタグ標識あ

るいはグルタチオン S 転移酵素融合タンパク質として大腸菌内で発現し、常法に従って精製された酵素を標品として用いた。培養・発現誘導・細胞破碎・可溶化・精製の条件は詳細に至適化した。すべての遺伝子組換え実験は文部科学省の指導に従い、各研究機関の承認を得て行われた。

c. 酵素アッセイと薬剤インビトロ試験

AOX 活性はユビキノールの酸化を 278nm での吸光度変化で測定した。NTPase の活性は NTP の加水分解の結果生じたリン酸をマラカイトグリーン法により定量した。ピルビン酸キナーゼの活性は 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。MGL 活性はメチオニン・システインの分解で生じたチオールおよびケト酸を DTNB, MBTH により誘導体化し定量した。

d. インビトロ抗原虫作用の評価

クリプトスポリジウム培養は AGS 培養細胞にオーシストを感染させ行なった。24 時間後にアスコフラノン誘導体を添加し、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。赤痢アメーバ HM1:IMSS cl6 株栄養型の培養は BI-S-33 培地を用いた無菌培養で行い、TFM 誘導体による増殖阻止は 48-72 時間培養後の細胞のデヒドロゲナーゼ活性を WST1 試薬を用いて評価した。

e. 動物感染モデルと薬効評価

クリプトスポリジウム感染は純粋分離後 1 ヶ月以内の 10^6 のオーシストを SCID マウスに 2 日連続経口投与することにより行なった。トキソプラズマ感染は 5 週齢の ICR マウス雌と高病原性 RH 株タキゾイト型虫体を用いた急性モデルと、ICR マウスと中程度の感染性を示す ME49 株の Cyst を用いた亜急性・慢性モデルを用いて行なった。いずれも腹腔内投与で感染させ、死亡を経時的にモニターするとともに、感染 50 日後に屠殺し脳組織破壊液中の Cyst 数を計測した。赤痢アメーバの感染実験はシリアンゴールデンハムスターの肝膿瘍モデルと C3H/HeJ マウスを用いた腸炎モデルを用いて行われた。前者では感染 6 日後に屠殺し肝臓の膿瘍と正常部位の重量を計測して、後者は糞便中の赤痢アメーバレクチン量を定量することによって感染の程度と治療効果を判定した。動物実験は関連法令を遵守して行われ、各研究機関の承認を得て行われた。

f. 赤痢アメーバ MGL 等の X 線結晶構造解析

蒸気拡散法にて結晶化を行なった。MGL の至適条件検討は Crystal Screen (Hampton Research) を用いて sparse-matrix sampling 法にて行なった。結晶はプロパルジルグリシン・アミノエトキシビニルグリシンなどの共結晶状態で作製するか、あるいは、酵素単体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。トキソプラズマの NTPase、及び関連種ネオスポーラの NTPase、更にクリプトスポリジウム AOX の結晶化も同様の方法で至適化した。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 で解析を行なった。

C. 研究結果

a. アスコフラノン誘導体の *C. parvum* のシアン耐性末端酸化酵素(CpAOX)に対する構造活性相関の確立

アスコフラノンは CpAOX, ChAOX をともに極めて低濃度で阻害し、 IC_{50} 値は約 1 nM であった。この IC_{50} 値は既存の AOX 阻害剤である SHAM の数千分の 1 であった。芳香環官能基の置換、リンカー長の変異、フラン環の変異などを導入した誘導体を用いた阻害試験の結果、芳香環部分、特にメチル基とクロル基が阻害作用に最も重要な役割を果たしていた。一方、不斉炭素を含むフラン環を除いても、リンカー部分の二重結合を除いても IC_{50} 値は 8 倍以内(2.7-8.0nM)の上昇にとどまり、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ことが可能となった。

b. 赤痢アメーバ原虫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

合成された一連の TFM 誘導体を用いて赤痢アメーバ原虫の殺滅作用を評価した。誘導体のうち、カルボン酸のアミド誘導体(WY200)は、TFMの IC_{50} 値(17.2 μ M)に比べ、5 倍程度高い有効性を示した。更にアミド基にベンジル基・フェニル基(SK254, SK258)を導入すると IC_{50} 値が 2.5 μ M まで減少した。更にベンゼン環にフロロ基やメトキシ基の置換を導入すると (WY244, WY252, SK336, SK337)、更に 2 倍程度薬効が上昇した。これらの TFM 誘導体は現在臨床で使用されているメトロニダゾールよりも格段に高いインビトロの薬効を示した。

c. 赤痢アメーバ MGL の結晶構造の解明

MGL を標的とした合理的創薬を達成するためにタンパク質高次構造の決定を行った。結晶化条件最適化の後、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 種類の阻害剤ならびに基質（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 β シートを含み側面を 8 本の α 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 β シートとその両側に位置する 5 本の α ヘリックスから構成されていた。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。活性中心の 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 γ -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。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 NH₂ 基、Ser335 の主鎖 NH と水素結合していた。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。以上の知見から MGL と基質・阻害剤の結合様式が詳細に明らかにされた。

d. トキソプラズマ・ネオスポーラ NTPase の結晶構造解析

NTPase 単体でも阻害剤共存下でも、六角柱の結晶が得られた。解像度は 6-8 Å 程度であり、タンパク質の電氣的不均一性が解像度の低さの原因であると予想された。

e. トキソプラズマの新規創薬標的ピルビン酸キナーゼ II(PKII)の解析

トキソプラズマ・ピルビン酸キナーゼ II は 1 価カチオン・ヌクレオチドの要求性などのいくつかの生化学的特徴を哺乳動物酵素と異にする、これまでの報告のない全く新しい酵素であった。更に、ミトコンドリアとプラスチド（葉緑体）に輸送されこれらのオルガネラで機能するダブルターゲット型の酵素であった。

f. アスコフラノンのクリプトスポリジウム症治療効果

アスコフラノンのインピボでの治療効果を SCID マウスの腹腔内投与系で評価したところ、投与開始後 8-10 日で 75%の個体でオーシストの排出が消失した。コントロールマウスでは継続的なオーシストの排出と体重の減少が観察されすべて投与開始が 60 日以内にすべてのマウスが死亡した。

g. NTPase 阻害剤のトキソプラズマ症治療実験

シスト感染によるトキソプラズマ慢性・亜急性感染モデルを用いて NTPase 阻害剤の薬効を評価した。2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole 投与により感染脳内の Cyst 数は対照に比べて半減したことが確認された。ピリメサミンと 2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole 混合投与による相加・相乗効果は認められなかった。

h. トリフルオロメチオニン誘導体による赤痢アメーバ肝膿瘍モデル・腸炎モデルの治療効果

新規トリフルオロメチオニン誘導体(WY200, SK254, SK258, WY241, WY244, WY252)の治療効果をハムスター肝膿瘍モデルで評価した。いずれの誘導体でも、1 頭あたり 3 μ mol 投与でトリフルオロメチオニンと同等の完全な治療効果が見られた。毒性は全く観察されなかった。

マウス腸炎モデルでもトリフルオロメチオニン治療により 6 匹中 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、部分的治療効果が認められた。

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た。

クリプトスポリジア症創薬に関する最も重要な成果は構造活性相関の確立とインピボ効果の確認

であった。臨床上問題となる *C. parvum* ならびに *C. hominis* AOX を用いて構造活性相関が確立された。アスコフラノンの IC₅₀ 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及びその誘導体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。不斉炭素を含むフラノン環並びにリンカー部分が活性に必須でないことが示され、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こと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。更に結晶構造解析を含め、今後の AOX の機能解析に繋がる研究基盤がしっかりと整備された。

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、インビボ試験において研究上の問題点に遭遇し、進展に予想以上の時間を要した。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。今後更なる結晶化条件、ソーキング法の至適化が必要である。しかしながら、インビボ試験でも 2-(1-Naphthalenylthio)-1-H-indole が慢性・亜急性モデルの脳 Cyst 数の減少に効果があることが示された。今後更に投与経路、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強く示唆している。同時にトキソプラズマ原虫に選択的に存在する新規酵素を発見し、その基盤的解析を終えた。

赤痢アメーバ症創薬に関してはいくつもの非常に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をもとに作製された第 1-3 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発見した。更に、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 に、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。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。

以上、3 種の原虫種により研究の展開の方向性と進展に若干の相違はあるが、いずれの原虫種に関しても、この 3 年間の研究期間で新規化合物の合成、構造活性相関の確立、インビトロ・インビボ検定という目的が達成された。今後本研究の成果に基づいて、抗赤痢アメーバ薬剤のうち、特に WY200, SK254, WY252, SK337 などを非臨床試験へ持ち込むことを国立感染症研究所、群馬大学とアリジェン株式会社との共同研究で実現したい。また抗クリプトスポリジウム薬剤アスコフラノン誘導体の中では、最も合成が簡単である化合物のひとつである 196-9 などを非臨床に持ち込むことを検討中である。

E. 結論

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研究は、新規化合物の合成、作用機序の理解、標的酵素の構造解明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。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ことと確信している。本研究班では原虫ごとに分かれて創薬研究を展開したが、山本が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、基盤的援助を行ったことがその成功の鍵となった。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クリプトスポリジウム・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. (2006) Biochemistry and Metabolism of *Toxoplasma gondii* (page185-206) *Toxoplasma gondii*. The Model Apicomplexan-Perspective and Method (Weiss and Kim eds) Elsevier Science
2. Saito T, Maeda T, Nishi M, Hashimoto H, Wu B, Roos DS, Takeuchi T, Asai T. (2007) A novel GDP-dependent pyruvate kinase isozyme from *Toxoplasma gondii* is targeted to both the mitochondrion and the apicoplast. *J. Biol. Chem.* (in press)
3. 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) Direct evidence for cyanide insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: Phylogenetic and Therapeutic Implication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 1044-1052
4. 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) Molecular cloning and characterization of *Trypanosoma vivax* alternative oxidase (AOX) gene, a target of the trypanocide ascofuranone. *Parasitol. Int.* 53, 235-245
5. 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.* F61, 875-878
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. Sario, 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
11. 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
12. Shinryo, N. and Kita, K. (2006) Up-regulation of Heme Biosynthesis during Neuronal Differentiation. *J. Biochem.* 139, 373-381
13. 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
14. 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) Verticypyrone, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Verticillium* sp. FKI-1083. *J. Antibiot.* 59, 785-790
15. 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 γ coactivator -1 α (PGC-1 α) Develops Muscle Atrophy with Depletion of ATP. *Am. J. Physiol.* 169, 1129-1139
16. 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
17. 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
18. 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
19. Mita, T., Tanabe, K., Takahashi, N., Tsukahara, T., Eto, H., Dysoley, 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
20. 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⁺ reductase from human malaria parasite. *J. Biochem.* in press
21. Kita, K., Shiomi K., and Omura, S. (2007) Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies. *Trends in Parasitol.* in press
22. Ghosh, S., Chan, J., Lea, C.R., Meints, G.A., Lewis, J.C., Tovian, Z., Flessner, R., Loftus, T.C., Bruchhaus, I., Fradley, K.L., Kendrick, H., Croft, S., Kemp, R., Kobayashi, S., Nozaki, T., and Oldfield, E. (2004) Effects of Bisphosphonates on the Growth of *Entamoeba* and *Plasmodium* species in vitro and in vivo. *J. Med. Chem.* 47, 175-187.
23. Kumagai, M, Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 2316-2323.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
 29. 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.
 30. Nozaki, T., Ali, V., and Tokoro, M. (2005) Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv. Parasitol.* 60, 1–99.
 31. 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* 4, 722–732.
 32. 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
 33. 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.
 34. Ali, V. and Nozaki, T. (2006) Biochemical and functional characterization of phosphoserine aminotransferase from *Entameba histolytica*, which possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Mol. Biochem. Parasitol.* 145, 71–83.
 35. 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.
 36. 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.
 37. Nozaki, T., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Haghighi, A. (2006) The diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. *Arch. Med. Res.* 37, 276–278.
 38. Okada, M. and Nozaki, T. (2006) New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch. Med. Res.* 37, 244–251.
 39. Nozaki, T. and Nakada-Tsukui, K. (2006) Membrane trafficking as a virulence mechanism of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.* 98, 179–183.
 40. 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., Ehrenkaufer, 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.
 41. 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.
 42. 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.
 43. Sato, D., Yamagata, W., Kamei, K., Nozaki, T. and Harada, S. (2006) Expression, purification, and crystallization of L-methionine γ -lyase 2 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62, 1034–

1036.

44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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 (国際学会のみ)
1. Kita, K. (2004) Parasite mitochondria as a target of chemotherapy. IX EUROPEAN MULTICOLLOQUIUM OF PARASITOLOGY, Valencia, Spain, July 2004
2. Kita, K. (2004) Diversity of Parasite mitochondria. 3rd International Eijkman Symposium, Indonesia, Sept. 2004.
3. Kita, K., Kobayashi, T., Sato, S., Mi-ichi, T., Tanaka, T., Komaki-Yasuda, K., Yano, K., Takamiya, S., Kawazu, S., Kano, S., Hirata, A., Onitsuka, I., and Miyajima, A. *Plasmodium* mitochondria as target of chemotherapy. Joint International Symposium of Tropicalmedicine, Bangkok, Thailand, Dec. 2004.
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. Saito, T., Maeda, T., Takeuchi, T., and Asai, T. (2004) Novel type pyruvate kinase isozyme localizes to mitochondrion in *Toxoplasma gondii*. Molecular Parasitology Meeting XV, Sept, 2004.
6. Saito, T., Maeda, T., Nishi, M., Roos, D.S., Takeuchi, T., and Asai, T. (2004) 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.
7. 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.
8. Ali, V. and Nozaki, T. (2004) 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.
9. 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.
10. Nakada-Tsukui, K., Ali, V., Saito-Nakano, Y., Okada, M., and Nozaki, T. (2004) Rab7A small GTPase regulates the transport of cytosolic 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.
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. Nozaki, T. (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.
 19. Nozaki, T. (2005) Molecular Parasitology in the Post-Genome Era. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 5-8, 2005, Awaji
 20. Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. (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
 21. Nozaki, T. (2005) Comprehensive analysis of vesicular trafficking *Entamoeba histolytica*. International Conference on Anaerobic Protists. September 17-20, 2005, Alghero, Italy
 22. Ali, V. and Nozaki, T. (2005) Characterization of cytosolic Fe-S cluster assembly anaerobic conditions in *Entamoeba histolytica*. September 17-20, 2005, Alghero, Italy
 23. Okada, M., and Nozaki, T. (2005) Proteomic Analysis of Phagosome Maturation of the Enteric Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. Molecular Parasitology Meeting. September 11-15, 2005, Woods Hole, USA
 24. Nozaki, T. (2005) 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.

25. Nozaki, T. (2006) 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.
26. Tokoro, M., Nakamoto, K., Kobayashi, S., and Nozaki, T. (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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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..
33. 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 Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Feb 1-3, 2007, Tokyo.

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