

比較を行った。また、両蛋白質をMycもしくはFlagタグを融合させた形で細胞内に発現させ、抗Myc抗体、抗Flag抗体による二段階の免疫沈降反応後に得られたサンプルに対しても同様の解析を行った。

(2) NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索

解析方法の概要を図1に示す。NS5A蛋白質を基質とするPKを探索するために、まず、NS5A蛋白質と相互作用するPKの同定を試みた。具体的には、NS5A蛋白質をコムギ胚芽無細胞転写・翻訳系で合成した。また、404種類のPKを包括するcDNAライブラリーから同様の方法でPKを取得した。その後、NS5A蛋白質とPKの相互作用をハイスループットな定量解析が可能であるAlphaScreen法を用いて解析した。本研究におけるAlphaScreen解析の概要を図2に示す。次に、NS5A蛋白質との間に強い相互作用が認められたPKに関して、NS5A蛋白質に対するリン酸化能を調べた。リン酸化能の評価は、精製PKを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在化において精製NS5A蛋白質と混和し、SDS-PAGEで展開後、オートラジオグラフィーを用いてリン酸化NS5A蛋白質のバンドを検出することにより行った(*in vitro*リン酸化アッセイ)。

(3) HCVの粒子形成過程を制御する宿主因子、PKの同定

HCVの細胞侵入過程の解析には、HCVエンベロップ蛋白質を粒子表面に被ったシュードタイプウイルスを使用した。HCVゲノム複製能はサブゲノミックレプリコンRNAを用いて、また、粒子形成能は全長HCV RNAもしくは感染性ウイルス粒子を用いて解析した。細胞にはHuH-7細胞及びその派生株を使用した。候補宿主因子及びPKの細胞内発現をsiRNAによりノックダウンした後、HCV

感染もしくはHCV RNAの導入を行い、HCVの細胞侵入効率、ゲノム複製能、粒子形成能を評価した。また、NS5A蛋白質のリン酸化状態をウェスタンブロットティング法により解析した。培養上清中の感染性ウイルス粒子量の測定は、培養上清を非感染細胞に処理後、感染巣（フォーカス）をカウントし、1 mLあたりのフォーカス形成単位 (FFU) を算出することにより行った。

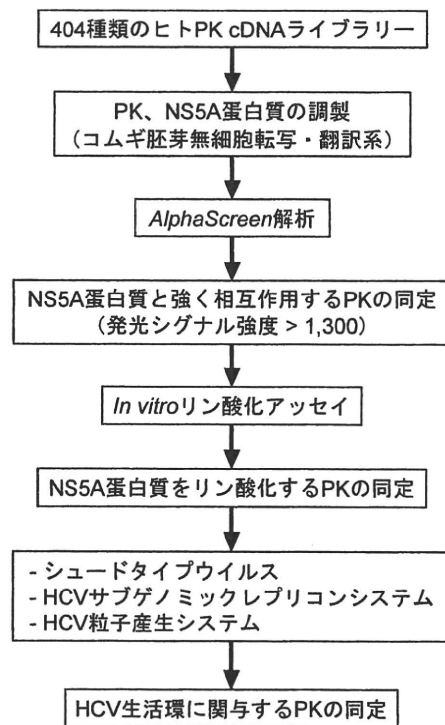


図1：解析方法の概要

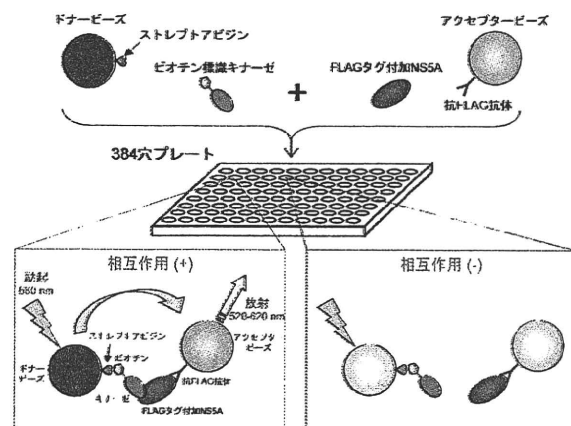


図2：本研究におけるAlphaScreen解析

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換えDNA実験委員会等の承認を受けて行った。組換えHCVの作製は遺伝子組換え生物等の第二種使用等にあたるため「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)の規定に従って申請を行い、承認を得た(大臣確認通知番号 大20-9 平成18年1月23日付17国文科振第47号、及び平成18年8月10日付18国文科振第16号)。

C. 研究結果

(1) NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の探索

抗NS5A抗体による免疫沈降産物のバンドパターンに関して、野生型JFH-1 RNA導入細胞と変異型JFH-1 RNA導入細胞との間に幾つかの相違がみられた。具体的には、約200 kDaと約170 kDaのバンドは野生型JFH-1 RNA導入細胞に多く、約35 kDaのバンドは変異型JFH-1 RNA導入細胞に多く認められた。一方、Myc付加NS5A蛋白質及びFlag付加Core蛋白質を細胞内に共発現させた系では、抗Myc抗体、抗Flag抗体による二段階の免疫沈降反応後に沈降産物をSDS-PAGEで分離し銀染色を行ったが、明らかなバンドを確認することはできなかった。

(2) NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索

1. NS5A蛋白質と強く相互作用するPKの探索

AlphaScreen法による解析において発光シグナル強度1,300以上を強固な蛋白質間相互作用と想定した時、このカットオフ値以上のシグナル強度を示したPKは89種類であった。このうち79種類がNS5A蛋白質のリン酸化に重要とされるセリ

ン/スレオニンPKであった。

2. NS5A蛋白質に対するリン酸化能の評価

AlphaScreen解析でスクリーニングされた79種類のセリン/スレオニンPKに対して*in vitro*リン酸化アッセイを行ったところ、9種類(TSSK2、PLK1、PKAC β 、CK1 α 、CK1 γ 1、CK1 γ 2、CK1 γ 3、CK1 ϵ 、CK2 α 2)にNS5A蛋白質に対する強いリン酸化活性が認められた。

(3) 同定された宿主因子、PKがHCVゲノム複製、粒子形成に与える影響の解析

NS5A蛋白質をリン酸化する9種類のPKがHCV生活環に役割を有するか否かを調べるために、各PKの細胞内発現をノックダウンした状態でHCVを感染させ、感染後のウイルス粒子産生量を解析した。CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2ノックダウン細胞から分泌される感染性ウイルス粒子量(ウイルス感染力価)がmock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞の1/5~1/10に抑制された。次に、これら3種類のPKがHCV生活環の中のどのステップに関わっているのかをより詳細に調べるために、シュードタイプウイルスを用いてHCVの細胞侵入過程を、サブゲノミックレプリコンシステムを用いてRNA複製能を、また、ウイルス感染が成立しないHuh7-25細胞を用いてHCV粒子形成能を解析した。HCVの細胞侵入効率及びRNA複製は、レポーターとしてウイルスに組み込まれた(シュードタイプウイルス)、もしくは、レプリコンに挿入されたルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標にして定量的に評価した。3種類のPKノックダウン細胞におけるHCVの細胞侵入効率及びRNA複製能は、mock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞と同程度であり、これらのPKの作用点はHCVの細胞侵入やゲノム複製のステップで

はないことが示唆された。HCV粒子形成能の評価は、全長HCV RNAをPK siRNAとともにエレクトロポレーション法でHuh7-25細胞に導入し、導入後3日目の上清中Core蛋白量を測定することにより行った。3種類のPKノックダウン細胞から分泌されるCore蛋白量はmock処理細胞もしくはコントロールsiRNA導入細胞における分泌Core蛋白量の1/3~1/2に減少したことから、HCV RNA複製能の結果と合わせて、ウイルス粒子形成以降の過程がこれらのPKの作用点である可能性が示唆された。最後に、3種類のPKが培養細胞内においてもNS5A蛋白質のリン酸化に関与するか否かを調べるために、PKノックダウン細胞にHCVを感染させ、NS5A蛋白質のリン酸化状態を解析した。CK1 α ノックダウン細胞では、コントロールsiRNA導入細胞と比べて、高リン酸化型NS5A蛋白質の発現低下及び高リン酸化型NS5A蛋白質/低リン酸化型NS5A蛋白質比の減少を認めた。一方、CK2 α 2ノックダウン細胞におけるNS5A蛋白質のバンドパターンは、コントロールsiRNA導入細胞と比べて、低リン酸化型NS5A蛋白質の発現低下及び高リン酸化型NS5A蛋白質/低リン酸化型NS5A蛋白質比の上昇を認めた。CK1 ϵ ノックダウン細胞におけるNS5A蛋白質のバンドパターンはコントロールsiRNA導入細胞のNS5A像と同様のパターンを呈していた。

D. 考察

(1) NS5A-Core蛋白質間相互作用を制御する宿主因子の探索

まず、NS5A-Core蛋白質間相互作用に関与する宿主因子をgenome-lengthのHCV複製細胞を用いて探索することを試みた。この手法により、ウイルス生活環に重要な役割を担う宿主因子が生理的な条件下で同定される可能性を期待できる。

しかし、免疫沈降産物の精製度を高めることが困難であり、未だに特定の宿主因子の同定には至っていない。一方、精製度を高めるために試みた二段階の免疫沈降反応では沈降バンドを確認することができなかった。NS5A-Core蛋白質間相互作用の強度がさほど強くないことに起因しているものと考えられる。

(2) NS5A蛋白質を基質とするPKの網羅的探索及び

(3) 同定された宿主因子、PKがHCVゲノム複製、粒子形成に与える影響の解析

404種類のヒトPKの中からNS5A蛋白質に対するリン酸化能を有し、かつ、HCV生活環に関与するPKを3種類同定可能であった。同定されたPKの中にはCK2の触媒サブユニットであるCK2 α 2が含まれていたが、CK2はNS5A蛋白質のリン酸化とHCV粒子形成に関与することが報告されており、本解析結果の妥当性が高いことを示している。

今回の解析で同定された3種類のPKは、いずれもsiRNAによるノックダウンでHCVの細胞侵入過程や複製活性には影響を与えずにウイルス粒子分泌量を低下させたことから、HCV生活環の後期過程であるウイルス粒子形成（もしくはそれ以降のステップ）に関与し、この過程を正に制御している可能性が示唆された。さらに、CK1 α のノックダウンはNS5A蛋白質の高リン酸化を著しく抑制しており、このPKの粒子形成過程への作用はNS5A蛋白質の高リン酸化制御を介している可能性が考えられた。最近、台湾の研究チームがサブゲノミックレプリコン細胞を用いて1,210種類のヒトプロテインキナーゼ及びホスファターゼを対象とした網羅的RNAiスクリーニングを行い、HCVゲノム複製にPolo-like kinase 1 (PLK1)というPKが関与することを報告した。

PLK1の作用点はHCVの複製過程であるが、その作

用は本研究で同定されたCK1 α と同様NS5A蛋白質の高リン酸化制御を介する。NS5A蛋白質の高リン酸化にはその中央領域に存在する複数のセリン残基が関与すると報告されているが、同じリン酸化パターンでも責任PKやNS5A蛋白質のリン酸化部位の違いによりHCV生活環における作用点が異なる可能性は十分に考えられる。この相違を明らかにするために、今後、責任PKによるリン酸化部位の同定や同定部位のリン酸化がHCV生活環に与える影響につき解析予定である。

E. 結論

NS5A蛋白質と相互作用し、NS5A蛋白質をリン酸化する新規セリン/スレオニンPKを網羅的手法により同定した。さらに、この中からHCVの粒子形成過程を制御する3種類のPK (CK1 α 、CK1 ϵ 、CK2 α 2)を取得した。本研究は、HCV粒子形成機構の解明や新たな創薬標的の同定に道を拓く可能性を有する。

F. 研究発表

1. 論文発表

(欧文論文)

- 1) Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 2011;410:38-47.
- 2) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C

virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J Virol* 2010;84:5824-5835.

(邦文論文)

- 1) HCV NS5A蛋白質のリン酸化に関与する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索. 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、脇田隆宇、澤崎達也、鈴木哲朗. *消化器内科*, 51巻、PP. 627-631、2010.
- 2) C型肝炎ウイルスの複製と粒子形成. 鈴木哲朗、原弘道、相崎英樹、鈴木亮介、政木隆博. *ウイルス*, 60巻、PP. 87-92、2010.

2. 学会発表

(国際学会発表)

- 1) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Kato T, Endo Y, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Identification of novel hepatitis C virus NS5A-associated protein kinases. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010. 9. 10-14.
- 2) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Kato T, Watanabe H, Wakita T. Effects of NS5A replacement in HCV JFH-1 genome on viral replication and infectious particle production in cell culture. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Tokyo, 2010. 9. 10-14.
- 3) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Tomonaga M, Masaki T, Kato T, Wakita T, Suzuki T. Role of ERAD pathway in quality control of HCV envelope proteins and maturation of the viral particles. 17th

International Symposium on Hepatitis C
Virus and Related Viruses. Tokyo,
2010. 9. 10-14.

2. 実用新案登録
なし。

(国内学会発表)

3. その他
なし。

- 1) 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗。HCV NS5A蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの同定と機能解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
- 2) 岡本有加、政木隆博、村山麻子、加藤孝宣、渡邊治雄、脇田隆字。HCV JFH-1株におけるNS5Aの置換がウイルス増殖に及ぼす影響の解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
- 3) Mohsan Saeed、鈴木亮介、渡邊則幸、政木隆博、加藤孝宣、脇田隆字、鈴木哲朗。
Role of ERAD pathway in life cycle of hepatitis C virus. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
- 4) 加藤孝宣、岡本有加、村山麻子、政木隆博、脇田隆字。HCVの増殖適応変異とその意義。第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010. 11. 7-9.
- 5) 政木隆博、松永智子、高橋宏隆、加藤孝宣、宮村達男、遠藤弥重太、澤崎達也、脇田隆字、鈴木哲朗。HCV NS5A蛋白のリン酸化に関する新規セリン/スレオニンプロテインキナーゼの探索。第46回日本肝臓学会総会、山形、2010. 5. 27-28.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし。

「政策創薬総合研究」

研究目的

本研究事業では、画期的・独創的な医薬品の創製、先端技術の医療・医薬への応用の実現化を目指し、創薬研究等の基盤技術の向上のため、基礎的研究の開発に資することを目的とする。特に、民間企業の創薬におけるニーズと国立研究機関のシーズとのマッチングを研究の核として、政策創薬総合研究とエイズ医薬品等開発研究における先端的・基盤的技術の研究開発を実施する。

研究方法

政策創薬総合研究の研究分野は、「稀少疾病治療薬の開発に関する研究」、「医薬品開発のための評価科学に関する研究」、「政策的に対応を要する疾患等の予防診断・治療法等の開発に関する研究」、および「医薬品等開発のための画期的創薬方法の開発、およびヒト組織・細胞の利用に関する研究」の 4 分野に加え、「医療上未充足の疾患領域における医薬品創製を目指した研究」の 5 分野で行い、エイズ医薬品等開発研究では、エイズワクチン等エイズ発症防止薬を中心に 3 分野で実施した。特に、民間からの国立研究機関への研究委託を中心とした官民共同研究を強力に推進し、単独では着手・展開が困難な研究分野を産官学が一体となって推し進めている。

結果

平成 22 年度は、重点研究（官民共同型）が 35 課題であり、企業 88 社、国立研究機関 11 機関、大学 38 校、団体・試験研究法人等 10 機関が参加して共同研究を実施した。若手研究者奨励研究は継続課題の 12 課題を実施した。その中で、終了課題は、重点研究 5 課題、若手研究者奨励研究 12 課題であり、本報告書にその成果をまとめた。

また、事後評価と中間評価実施の課題数は 23 課題であり、事後評価結果は、23 年度申請課題の事前評価に反映した。また、平成 22 年度は 3 年サイクルで実施してきた官民共同型の研究課題の、最多の入れ替え時期でもあり、応募 32 課題中、25 課題を新規課題とした。なお、平成 22 年度開始の 24 課題を含めた官民共同研究の 30 課題は、23 年度から新たな研究事業としてスタートする政策創薬総合研究事業に継続課題として含めて実施することとした。

平成 23 年 5 月

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

平成22年度

政策創薬総合研究事業

政策創薬総合研究

研究報告書

平成23年5月

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 タナカ印刷株式会社

201009014A (2/2)

政策創薬総合研究事業

厚生労働科学研究費補助金

平成22年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

平成23(2011)年3月

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成22年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

目 次

課題番号

重点研究

A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

KAA1551 エイズに付随する日和見原虫感染症に対する新規薬剤の実用化 野崎 智義 …… 1

C分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

KAC1601 エイズの粘膜ワクチンの創製と評価系の基盤構築 三隅 将吾 …… 13

若手研究者奨励研究

A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

KAA3731 サルエイズウイルスのヒトへの異種間感染伝播に関わるウイルス側・宿主側制御因子の相互作用機構に関する解析 武内 寛明 …… 19

B分野 エイズ発症防止薬の開発に関する研究

KAB3732 Claudin-4 binderを利用したパイエル板標的型経口エイズワクチンの開発 磯田 勝広 …… 31

C分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

KAC3762 エイズ発症サルモデル確立のためのHIV-1病原性クローンの構築：遺伝子工学的改変と細胞馴化によるウイルスの変異・進化の戦略的利用 野間口雅子 …… 44

KAC3763 密着結合蛋白質を利用した経鼻エイズワクチン基盤技術の開発 近藤 昌夫 …… 55

KAC3764 新規多機能性キトサンによる遺伝子導入システムの開発とDNAワクチンへの応用 樋口ゆり子 …… 87

重点研究

エイズに付随する日和見原虫感染症に対する新規薬剤の実用化

所 属 国立感染症研究所・寄生動物部
研究代表者 野崎 智義
研究期間 平成20年4月～平成23年3月

研究要旨 エイズに付随する原虫感染症であるクリプトスポリジウム症ならびに赤痢アメーバ症に対する新規創薬を実現するために、クリプトスポリジウムシアン耐性酸化酵素(AOX)、赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼ(MGL)等含硫アミノ酸代謝を標的とした創薬研究を展開した。標的酵素の酵素学的解析・生理機能の解明などのバリデーション、結晶構造による反応機構の解明、インビトロ・インビボ薬効試験、安全性試験などを終了した。また、今後の新しい創薬標的を網羅的代謝解析により明らかにした。以上、本研究は日和見原虫感染症に対する新規薬剤開発における優れた一つのモデルを提供したと考えられる。

分担研究者

- (1)アリジェン製薬株式会社 山本 雅一
- (2)東京大学・大学院医学系研究科 北 潔
- (3)国立感染症研究所・寄生動物部 中野由美子

A. 研究目的

寄生性原虫による感染症、特に、クリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症は、エイズに付随する感染症として極めて重要である。クリプトスポリジウム症は、途上国では小児及び免疫低下状態で発症する下痢症の重要な原因原虫であるが、先進国でも、また途上国でも、HIV/AIDSを始めとする免疫不全状態で劇症の下痢を起こす。現在、劇症クリプトスポリジウム症に有効な特効薬はない。一方、赤痢アメーバ症は、発展途上国を中心とする重要な下痢症の原因原虫であるが、日本国内においても患者数は毎年微かに増加傾向にあり、感染症法で規定された原虫症・寄生虫症の中で最も注視すべき寄生虫症である。近年、Commercial Sex Worker (CSW)を始めとする女性における感染の拡大が問題視されるとともに、知的障害者施設における感染も広く報告されている。良く認知されているように、アメーバ症は海外旅行歴をもたない国内の男性同性愛者に濃厚に感染し、HIV/AIDSを含む他の性行為感染症との混合感染が多い。現行の赤痢アメーバ症治療はメトロニダゾールにより行われている。しかしながら、薬剤耐性株の出現、治療抵抗臨床例の増加などの問題が表面化しつつある。一方で、メトロニダゾールは変異原性・催奇形性をもつことが実験的に良く知られており、妊婦・乳幼児に対する投薬は以前より避けられてきた経緯がある。以上のように、国内に浸透する赤痢アメーバ症の問題は深刻である。以上のような現状に鑑み、クリプトスポリジウム症ならびに赤痢アメーバ症に対する新規化学療法剤の標的分子の基盤的研究、更にはそれに根ざした具体的な創薬研究が

急に必要とされている。本研究ではこれら原虫症に対する新規創薬の実現を目指し、研究を行った。

B. 研究方法

1. *Cryptosporidium parvum* (Cp) 末端酸化酵素(AOX)の酵素学的解析、局在解析、インシリコ解析

オーシストの精製はショ糖浮遊法、塩化セシウム密度勾配法によった。CpAOXの大腸菌組換え体を発現した細胞からの膜画分の精製法を至適化した。また、AOXのアッセイ法を確立した。詳細は各年度の分担・総括研究報告書に譲る。CpAOXのアミノ末端部位欠失変異体による生化学的解析はCpAOX N末端側配列からそれぞれ47、70、93、116アミノ酸を欠失させた変異体(Cp48AOX, Cp71AOX, Cp94AOX, Cp117AOX)を常法に従い作製した。CpAOXのアスコフラノン誘導体の感受性試験は常法に従った。ゲノムデータベースは *C. parvum* と *C. hominis* を用いた (<http://nsc.jcibi.org>)。

2. トリフルオロメチオニン(TFM)誘導体の合成とインビトロ、インビボ感受性試験

誘導体合成法の詳細は分担研究報告書による。インビトロ試験はBI-S-33培地中で48時間後に評価した。IC50は常法に基づき算出した。インビボ試験はハムスター肝臓瘍モデルで6日後に評価した。

3. 赤痢アメーバの創薬標的のバリデーション

メチオニンガンマリアーゼ(MGL)がTFMの標的であることを確認するために、常法に従い、赤痢アメーバのMGL1及びMGL2発現抑制株を作成した。発現抑制体のTFMへの感受性を計測した。更にDNAマイクロアレイを用いて全遺伝子の発現解析を行い、発現変化した遺伝子を抽出した。

4. 赤痢アメーバ MGL の結晶構造の解明

MGL1 及び MGL2 は GST 融合タンパク質として合成し、グルタチオンセファロース 4B、Sephacryl S300、MonoQ で精製・透析後た。結晶化はシッティング蒸気拡散法により作成し、sparse-matrix sampling 法に至適化した。播磨理化学研究所 Spring8 の BL44XU の放射光を用いて回折像を得、精密化等は HKL2000 で行った。

5. 赤痢アメーバの酸化ストレスモニタリングと網羅的代謝解析手法

メタボローム解析はキャピラリー電気泳動法-飛行時間計測質量分析 (CE-ToFMS) により行った。データ取得と解析は G2201AA ケムステーションソフトウェアとマスターハンドを用いた。脂質解析は 2 次元薄層クロマトグラフィー法で展開し、ヨウ素により可視化した。

6. TFM 誘導体の安全性試験

ラット単回投与毒性試験、Salmonella typhimurium を用いた遺伝子突然変異誘発性試験、マウス小核試験、ほ乳動物培養細胞染色体異常予試験を行った。詳細は分担報告書による。

7. クリプトスポリジウム AOX 阻害剤の大量合成

クリプトスポリジウム症と共通の酵素を有するトリパノソーマ原虫のインビトロ試験の結果より、薬効の認められた 4 種類化合物の合成を検討した。合成検討の結果、234-12-OPiv のグラム単位での合成に成功した。

C. 研究結果

1. *C. parvum* AOX の精製法の確立、反応速度論的解析、オルガネラ標的シグナルの同定

C. parvum のオーシストから AOX 活性を保ったままミトソームを精製する方法を確立した。来ノール酸化酵素、NADH 酸化酵素、NADH-キノン還元酵素の活性を確認し、今後の生化学的検討を可能とした。この標品を用いて速度論的解析を行なったところ、界面活性剤非存在下においてミカエリスメンテン型の反応様式を示すことが判った。Vmax は 287 ± 63.7 nmol/min/mg, Km は 104 ± 14.4 μ M であった。更に、クリプトスポリジウム *C. parvum* AOX の N 末端部位欠失変異体による生化学的解析を行い、N 末端側領域が短くなるにつれて比活性は低くなり、N 末端 71~94 アミノ酸が活性に重要であることが示された。また、ミトソーム移行シグナルは 34 アミノ酸と推定された。

2. トリフルオロメチオニン (TFM) 誘導体のインビトロ、インビボ試験

現在臨床で用いられているメトロニダゾールと比較して、一部の TFM 誘導体は TFM 或はメトロニダゾールに比べ優れた効果を示した。特に、TFM-01-05 は 2-3 μ M 程度の、TFM-07-09 は 1.1-1.3 μ M 程度の IC50 を示した。TFM-01/02 は TFM のカルボキシル基のアミド付加体に更にベン

ジル・アニリドなどの修飾が付けられたものである。TFM-03-05 は TFM-01 のフッ素置換体である。

TFM-07-09 は TFM-01 メトキシ基置換体である。

上記 TFM 誘導体のアメーバ症治療効果を検証した。TFM-04/05/07/14 が TFM と同等の効果を示した。一方、TFM-06/09/11/15 は効果を示さなかった。一方インビトロでは著効を示さなかった TFM-14 はインビボで優れた効果を示した。

3. 赤痢アメーバの創薬標的のバリデーション

赤痢アメーバ MGL1, MGL2 抑制株は通常の培養条件下 (TFM 非存在下) で軽微な増殖率低下を示した。TFM 存在下で MGL1, MGL2 発現抑制株では、薬剤非存在下と同様の増殖を示した。

MGL1, MGL2 抑制形質転換体のトランスクリプトーム解析の結果、それぞれ 7, 13 遺伝子が優位に変化していた。いずれの発現抑制株でも MGL1 及び 2 の発現が 79-370 分の 1 に減弱していた。それ以外に 4 倍以上発現が優位に変化した遺伝子はなかった。このことは gene silence 法による遺伝子特異性と TFM の標的が MGL だけであることを証明した。

4. 赤痢アメーバ MGL の結晶構造の解明

分解能は MGL1, MGL2 ともに 2.5Å であった。MGL1 と MGL2 では TFM のトリフルオロメチル基が向く方向が異なっていた。つまり、MGL1 ではトリフルオロメチル基が Arg55 の方に傾いているのに対して、MGL2 ではほぼ真上に伸びていることが分かった。また、MGL1 では TFM のトリフルオロメチル基と Cys110 との距離は 3.63Å であり、水素結合をしていた。MGL2 でもトリフルオロメチル基と Cys113 との距離は 3.79Å であり、水素結合していた。さらに、MGL2 では TFM の硫黄原子に Arg58 のグアニジウム基が 3.28Å まで接近していた。よって MGL2 での TFM の γ -脱離反応には、Arg58 のグアニジウム基が反応に直接関わっている可能性が考えられた。

更に、MGL1/L-メチオニン複合体-酵素反応中間体として 1-5 の反応進行状態の異なる 5 種類の反応中間体構造が得られた。詳細は H21-22 年度の分担報告書に譲るが、MGL によるメチオニン分解の反応機構が詳細に解明された。

また、詳細な解析により、MGL1 で PLP と Cys110, Tyr108, Tyr53*, Lys234*, Asp235*, Arg55* による水素結合ネットワークがすべての分子で形成されていることが明らかになった。一方、MGL2 では異なった水素ネットワークが存在した。MGL1 活性部位に存在する水素結合ネットワークは酵素活性で 2 つの役割を担っていると考えられる第一には PLP のリン酸基-Arg55*/58*-Tyr108/111 による Tyr108/111 のチロシネートアニオン化である。第二に、活性部位と MGL 分子外の水分子との間でプロトンを運搬する役割である。よって、この水素結合ネットワークは L-メチオニンの γ 脱離反応を効率よく進めるために必要な機構であり、このネットワー

ク形成が不規則な MGL2 は L-メチオニンに対する活性が低いと考えられた。

更に、他の PLP 依存性酵素 γファミリー、特にシスタチオニンガンマ合成酵素 CGS との構造比較により MGL1 のより高い活性の理由が構造的に説明された。また、他種の MGL との比較により、MGL2 の Glu16 周辺環境が L-メチオニンより大型の基質に対する活性に寄与していると推定された。

5. 赤痢アメーバの酸化ストレス応答

システイン枯渇により細胞内の ROS 量は顕著に蓄積した。また、含硫アミノ酸代謝経路に明瞭な変化が生じた。特に、明瞭な O-アセチルセリン(OAS)と S-メチルシステイン(SMC)の蓄積が見られた。また、S-アデノシルメチオニン(SAM)とセリンの軽微な蓄積も見られた。SMC はシステイン合成酵素(CS)の 3 種のアイソタイプにより合成された。システイン飢餓に伴い、アミノアルコールの代謝物に大きな変化が生じた。更に、下流のフォスファチジルリン脂質、特にフォスファチジルイソプロパミルアミン(PtdIspn)が蓄積した。この PtdIspn の蓄積は D-システインで相殺されなかった。またパラコートによっても見られなかった。

6. TFM 誘導体の安全性試験

ラット単回投与毒性試験により、HY-715 及び HY-720、HY-716 は比較的高い概略の致死量範囲にあるものと推測された。Salmonella typhimurium を用いた遺伝子突然変異誘発性試験では、HY-716 及び HY-717 は遺伝子突然変異を誘発しないものと判断された。マウス小核試験により、HY-716 は骨髄細胞の増殖を抑制する物質であると判定された。ほ乳動物培養細胞染色体異常予試験の結果、染色体構造異常及び数的異常細胞の増加は認められず、HY-716 はほ乳類培養細胞に対し染色体異常誘発性を有しないと考えられた。

7. クリプトスポリジウム AOX 阻害剤の大量合成

薬効の認められた 4 種類化合物の合成を検討した。合成検討の結果、234-12-OPiv のグラム単位での合成に成功した。方法の詳細は H22 年度分担研究報告書に譲る

D. 考察

本研究は HIV 感染に付随する日和見原虫感染症に対する我が国発の抗原虫薬剤の実現を目指した。特に、赤痢アメーバ症に対する創薬に関しては、TFM 誘導体の中から候補化合物を絞り込み、創薬標的のバリデーションを、標的酵素の生理機能の解明、ノックダウンによる感受性の喪失、標的の立体構造解析を通じて統合的に達成した。そのいずれの分野でも、十分な成果と知見を蓄積した。不運にも 2 年度に安全性に若干の問題が発見

され、開発パイプラインの見直しを余儀なくされた。そこで最終年度は、創薬標的である含硫アミノ酸代謝経路の生理的意義をより深く理解し、今一度、本経路における別の酵素を標的とすることを視野に、今後の創薬の基盤を作ることを目指した。CE-ToFMS を用いたメタボローム解析手法を用いて、システイン飢餓(=酸化ストレス)が含硫アミノ酸などの代謝にどのような影響を示すかを網羅的に解析した。その結果、これまで全く知られていなかった代謝物、代謝経路が発見されるとともに、システイン飢餓が中心代謝に重篤な変化と傷害を与えることが示された。したがって、含硫アミノ酸代謝の創薬標的としての正当性は一段とバリデートされたと言える。

一方でクリプトスポリジウム症に対する創薬は予定した進展を生むことができなかった。主な理由は、アスコフラノン誘導体の合成が極めて多段階であり、プロセスサーチによる効率的な全合成経路が確立できなかったことによる。今後、発酵と合成を組み合わせさせた誘導体合成も視野に入れながら、シナジーを期待できる呼吸鎖の別の標的酵素に対しても、研究努力を振り向ける必要がある。しかしながら、オーシストからのマイトソームの精製法、組換え体の確立、更にほぼ終了した AOX の結晶構造の解明により、今後の AOX 創薬の展開は十分に期待できる。また、AOX に有効な 234-12-Opiv の合成も今後の安全性試験等に有効に活用されると期待される。

本研究で示したパイプライン、即ち標的の発見、生理機能の証明、バリデーション、高次構造の理解に基づく反応機構の解明、薬効・安全性試験は今後の、HIV に付随する原虫症に対する創薬に、優れた開発モデルを提供したと言える。今後、赤痢アメーバ、クリプトスポリジウム創薬は標的を若干変更しながらも継続されるが、本研究で得られた経験・ノウハウは確実に今後の開発研究に生かされると考えられる。

E. 結論

本研究は HIV 感染に付随する日和見原虫感染症に対する我が国発の抗原虫薬剤の創成を目指した。クリプトスポリジウム症の化学療法標的である AOX の精製法、酵素学的解析を終了した。AOX の阻害剤の大量合成に成功した。赤痢アメーバの創薬標的 MGL の生理機能や標的としての重要性を解明し、含硫アミノ酸代謝の創薬標的としての正当性が証明された。TFM 誘導体のインビトロ・インビボ薬効試験を終了し、安全性試験を終了した結果、現在選択された候補化合物に安全性に若干の問題が発見された。MGL の反応機構が詳細に解明された。以上、本研究の成果はクリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症創薬の今後の発展に貢献する十分な成果を達成した。

F. 研究発表(重要な論文発表のみ)

Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Metabolome analysis revealed increase in

- S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 285, 39160-39170.
- 佐藤暖、野崎智義 (2010) 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有効性 *ビタミン* 84, 250-254.
- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsue, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Two Atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, 285, 26889-26899.
- Yousuf, M. A., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2010) Localization and targeting of unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* 9, 926-933.
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., and Nozaki, T. (2010) Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Exp. Parasitol.* 126, 337-347. (Review)
- Sato, D., Kobayashi, S., Yasui, H., Shibata, N., Toru, T., Yamamoto, M., Tokoro, G., Ali, V., Soga, T., Takeuchi, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. (2010) Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35, 56-61.
- Escueta-de Cadiz, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Tachibana, H., and Nozaki, T. (2010) Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. *Parasitol. Int.* 59, 75-81.
- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Ali, V., and Nozaki, T. (2010) Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 100-104.
- Chung Chau Hon, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki and Nancy Guillén (2010) Dissecting the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* from a Genomic Perspective. In "Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology" Edited by C. Graham Clark, Patricia J. Johnson and Rodney D. Adam. Caister Academic Press, ISBN: 978-1-904455-61-5, March 2010.
- Masuda, I., Matsuzaki, M. and Kita, K. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. *Acta Crystallographica* (2010) F66, 275-278.
- Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and Kita, K. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. *Acta Crystallographica* (2010) F66, 304-308.
- Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* (2010) 1797, 443-450.
- Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H. and Kita, K. Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. *Parasitol. Int.* (2010) 59, 560-564.
- Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. (2010) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallographica* F66, 275-278
- Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2009) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39-47.
- Sato, D. and Nozaki, T. (2009) Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life*, 61, 1019-1028.

- Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 21731-21736.
- Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 157-161
- Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita K. (2009) Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *J. Biochem.* 145, 229-237
- Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ōmura, S., Miyoshi, H. and Kita, K. (2009) Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1787, 129-133
- Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263
- Mogi, T. and Kita, K. (2009) Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits a and b in *Plasmodium* spp. *Mitochondrion*, 9, 443-453
- Matoba, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Inaoka, D.K., Kita, K. and Harada, S. (2009) Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Acta Crystallographica*, F65, 933-936
- Maréchal, A., Kido, Y., Kita, K. Moore, A. and Rich, P. (2009) Three redox states of *Trypanosoma brucei* alternative oxidase identified by infrared spectroscopy and electrochemistry. *J. Biol. Chem.* 284, 31827-31833
- Sato, D., Yamagata, W., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Kinetic characterization of methionine gamma-lyases from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine, a promising lead compound against amoebiasis. *FEBS J.* 275, 548-560.
- Sato, D., Karaki, T., Shimizu, A., Kamei, K., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine γ -lyase 1 from *Entamoeba histolytica*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, 697-699, 2008.
- Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2008) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39-47.
- Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, Kita K., and Marzuki S. (2008) Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo2) of the cytochrome b gene. *Parasitol. Int.* 57, 229-232
- Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Shimizu, H., Shiba, T., Kurisu, G., Nara, T., Aoki, T., Kita, K. and Harada, S. (2008) Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry* 47, 10881-10891
- 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

エイズに付随する日和見原虫感染症に対する新規薬剤の実用化

所属 国立感染症研究所・寄生動物部
研究者 野崎 智義

研究要旨 エイズに付随する日和見原虫感染症であるクリプトスポリジウム症ならびに赤痢アメーバ症の新規創薬を実現するために、クリプトスポリジウムシアン耐性酸化酵素(AOX)、赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼ(MGL)等含硫アミノ酸代謝を標的とした創薬研究を展開した。3年度は、クリプトスポリジウム AOX の反応速度論的解析を行うとともに、ミトソーム輸送に必要な領域を同定した。AOX 活性を阻害する阻害剤の大量合成を達成した。赤痢アメーバの結晶構造から反応機構、特に反応における水素ネットワークの重要性を解明した。また、網羅的代謝解析により、システイン飢餓による含硫アミノ酸等の代謝変化の俯瞰が達成された。以上、最終年度の研究は順調に展開した。

分担研究者

- (1) アリジェン製薬株式会社 山本 雅一
- (2) 東京大学・大学院医学系研究科 北 潔
- (3) 国立感染症研究所・寄生動物部 中野由美子

A. 研究目的

寄生性原虫による感染症、特に、クリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症、トキソプラズマ症は、エイズに付随する感染症として極めて重要である。小腸の感染症であるクリプトスポリジウム症は、途上国では小児及び免疫低下状態で発症する下痢症の重要な原因原虫であるが、先進国でも、また途上国でも、HIV/AIDSを始めとする免疫不全状態で劇症の下痢を起こす。現在、劇症クリプトスポリジウム症に有効な特効薬はない。大腸感染症のひとつである赤痢アメーバ症も、発展途上国を中心とする重要な下痢症の原因原虫である。日本国内における患者数は毎年微かに増加傾向にあり、感染症法で規定された原虫症・寄生虫症の中で最も注視すべき寄生虫症である。近年、Commercial Sex Worker (CSW) を始めとする女性における感染の拡大が問題視されるとともに、知的障害者施設における感染も広く報告されている。良く認知されているように、アメーバ症は海外旅行歴をもたない国内の男性同性愛者に濃厚に感染し、HIV/AIDSを含む他の性行為感染症との混合感染が多い。現行の赤痢アメーバ症治療はメトロニダゾールにより行われている。しかしながら、薬剤耐性株の出現、治療抵抗臨床例の増加などの問題が表面化しつつある。一方で、メトロニダゾールは変異原性・催奇形性をもつことが実験的に良く知られており、妊婦・乳幼児に対する投薬は以前より避けられてきた経緯がある。以上のように、国内に浸透する赤痢アメーバ症の問題は深刻である。以上のような現状に鑑み、クリプトスポリジウム症ならびに赤痢アメーバ症に対する新規化学療法剤の標的分子

の基盤的研究、更にはそれに根ざした具体的な創薬研究が危急に必要とされている。

B. 研究方法

1. *Cryptosporidium parvum* (Cp) AOX の酵素学的解析

2年度までに確立した方法により CpAOX を過剰発現させた大腸菌から膜画分を精製した。詳細は分担研究報告書に譲る。細胞回収後、菌体湿重量 1 g あたり 5 mL の 20%(w/v) ショ糖 50 mM Tris-HCl (pH7.5) に懸濁し、0.1 mM PMSF、protease inhibitor cocktail (for bacterial use, SIGMA) を添加し、超音波処理により細胞を破碎した。遠心にて未破壊細胞を除去した上清を超遠心して得られた沈殿を 20%(w/v) ショ糖 50 mM Tris-HCl (pH7.5) に懸濁したものを大腸菌膜画分とした。キノール酸化活性は 50 mM Tris-HCl (pH7.3) 中にサンプルを加えて攪拌した 4 分後に基質である 150 μ M ユビキノールの添加することにより反応を開始させた。278 nm での吸光度変化を観測した (JASCO 分光光度計 V-660、モル吸光係数 $\epsilon = 15000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)。

2. CpAOX のアミノ末端部位欠失変異体による生化学的解析

CpAOX N末端側配列からそれぞれ 47、70、93、116 アミノ酸を欠失させた変異体 (以下それぞれ Cp48AOX, Cp71AOX, Cp94AOX, Cp117AOX) を情報に従い作製した。PCR 増幅産物は Nde I, BamH I 切断後、pET15b ベクターにクローニングし、FN102 に形質転換した。

3. 赤痢アメーバの網羅的代謝解析手法

キャピラリー電気泳動法-飛行時間計測質量分析 (CE-ToFMS) はアジレント社製電気泳動、と質量分析計、HPLC ポンプ、スプレーヤーを用いた。

データ取得と解析は G2201AA ケムステーションソフトウェアとマスターハンドを用いた。CE-ToFMS の条件は既存の方法に従った。安定同位体は [U-13C5, 15N]L-methionine [U-13C3, 15N]L-serine を用いた。詳細は、Husain et al. (J. Biol. Chem. 285, 39160-39170, 2010) に記述した。

4. 赤痢アメーバの培養と酸化ストレスモニタリング

赤痢アメーバ HM1:IMSS cl6 株のインビトロ培養は BI-S-33 培地を用いた無菌培養系で行った。酸化ストレス負荷は、通常の BI-S-33 培地から L-cysteine と ascorbic acid を除外し、48 時間培養することで行った。Reactive oxygen species (ROS) の定量は、細胞を 2', 7'-DCF-DA と 30 分間混和後に 492nm の励起波長で励起し、519nm での放出光を計測し、ROS 量を測定した。システイン、S-メチルシステイン合成活性は常法に従い acetate kinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase とのカップリングによる酢酸の合成を計測し、システイン、S-メチルシステイン合成活性を測定した。

5. 赤痢アメーバの酸化ストレスによる脂質解析

脂質の抽出は Bligh/Dyer の方法に従った。抽出された脂質は 2 次元薄層クロマトグラフィー法で展開し、ヨウ素により可視化した。

6. 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼ (MGL)1 の精製

合理的創薬に不可欠な結晶構造の解明のために、MGL1 (AB539797) を GST 融合タンパク質として発現させ、グルタチオンセファロース 4B、Sephacryl S300、MonoQ で精製・透析後、標品とした。MGL1 は蛋白質発現の際に、M9 培地にチアミン・ピオチン・FeCl₃ を添加した改良 M9 培地を使用した。最終的な精製した MGL1 には N-末端ベクター由来の 10 残基 (GPLGSPEFPFG) を含んだ。

7. 赤痢アメーバ MGL1 の結晶化及び X 線結晶構造の解明

シッティング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 法にて行った。MGL1 の結晶は 1.8M 硫酸アンモニウム、0.1M カコジル酸バッファー、pH 6.2、0.01M ベタイン存在下で 277K、7 日間インキューベートすることにより 100 μm の結晶を得た。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。位相決定は、昨年度すでに構造解析した MGL2 をモデルとした分子置換法で行った。分子置換は CCP4 package の Morlep プログラムで 8.0-4.0 Å の分離能の回折データを使用した。続いて、CCP4 package の REFMAC5 プログラムによる鋼体精密化と精密化、COOTP プロ

グラムによるモデルの検討と修正を行った。R factor が 30% に達したところで、電子密度 Fo マップの 1.2σ 以上のピークに水分子を置いた。さらに [tlsmd server \(http://skuld.bmsc.washington.edu/~tlsmd/\)](http://skuld.bmsc.washington.edu/~tlsmd/) で各モノマーの Translation /Libration/Screw (TLS) groups を決定し、TLS 精密化を行って最終モデルとした。

9. クリプトスポリジウム AOX 阻害剤の大量合成
クリプトスポリジウム症と共通の酵素を有するトリパノソーマ原虫のインビトロ試験の結果より、薬効の認められた 4 種類化合物の合成を検討した。合成検討の結果、234-12-OPiv のグラム合成に成功した。

C. 研究結果

1. クリプトスポリジウム C. parvum AOX 反応速度論的解析

CpAOX の膜画分を用いて速度論的解析を行なったところ、界面活性剤非存在下においてミカエリスメンテン型の反応様式を示すことが判った。V_{max} は 287 ± 63.7 nmol/min/mg、K_m は 104 ± 14.4 μM であった。

2. クリプトスポリジウム C. parvum AOX の N 末端部位欠失変異体による生化学的解析

N 末端部位欠失変異体 Cp48AOX、Cp71AOX、Cp94AOX、Cp117AOX を大腸菌 FN102 において発現させた。大腸菌膜の比活性は、164 nmol/min/mg、57.8 nmol/min/mg、24.2 nmol/min/mg、検出限界以下であった。N 末端側領域が短くなるにつれて比活性は低くなり、全長アミノ酸を有する組換え CpAOX と比較して、組換え Cp48AOX では同程度、組換え Cp71AOX では 2~3 分の 1、組換え Cp94AOX では 7 分の 1 程度であった。AOX は高い疎水性のために SDS-PAGE において実際の分子量よりも移動が早いことが知られている。この欠失変異体を分子量マーカーとしたところ、CpAOX 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出された 28 kDa のタンパク質は 36.8 kDa であり、マイトソーム移行シグナルは 34 アミノ酸と推定された。

3. システイン除去による赤痢アメーバ内での代謝物の変化

通常の培地からシステインを除去することにより、細胞内のシステイン及びシスチンの枯渇が見られた。また、細胞内の ROS 量は、パラコート処理と同程度に蓄積した。システイン枯渇により、含硫アミノ酸代謝経路に明瞭な変化が生じた。特に、明瞭な O-アセチルセリン (OAS) と S-メチルシステイン (SMC) の蓄積が見られた。また、S-アデノシルメチオニン (SAM) とセリンの軽微な蓄積も見られた。

4. 赤痢アメーバ中での S-メチルシステイン

(SMC)を合成する酵素の特定

システイン合成酵素(CS)が SMC の合成に関与する可能性を検証した。赤痢アメーバのゲノムには SMC の合成に関与する可能性のある酵素として CS1, CS2, CS3 の 3 種のアイソタイプが存在する。代表的な CS1, CS3 を用いて、SMC 合成の活性、基質親和性、反応速度を比較したところ、CS1, 3 ともにほぼ同程度の SMC 合成活性を有した。

5. 赤痢アメーバ中でのシステイン枯渇により惹起されるアミノアルコール、アミノアルコールリン脂質への影響

システイン飢餓に伴い、アミノアルコールの代謝物に大きな変化が生じた。更に、下流のフォスファチジルリン脂質の量を 2 次元薄層クロマトグラフィーにて評価したところ、システイン枯渇によりフォスファチジルイソプロパミルアミン(PtdIspn)が蓄積した。この PtdIspn の蓄積は D-システインで相殺されなかった。またパラコートによっても見られなかった。

6. 赤痢アメーバ MGL 活性部位の水素結合ネットワークの発見

MGL の活性部位には PLP とシステイン残基、2 つのチロシン残基、リジン残基、アスパラギン酸残基、アルギニン残基による特徴的な水素結合ネットワークが存在する。特にシステイン残基は外の PLP 依存性酵素 γ -ファミリー にはなく、MGL のみで保存されているアミノ酸残基である。MGL におけるこのシステイン残基の変異体の酵素活性実験から、MGL の L-メチオニンに対する酵素活性に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。

今回の解析では、PLP と Cys110, Tyr108, Tyr53*, Lys234*, Asp235*, Arg55*による水素結合ネットワークがすべての分子で形成されていることが明らかになった。一方、MGL2 では Cys113 側鎖がダブルコンフォメーション構造をとっていた。また、Lys237*側鎖は dis-order しており、側鎖の C γ 以降がフレキシブルに動いていた。つまり MGL2 は水素結合ネットワークが形成されている分子とされていない分子は混合していた。Cys113 と Lys237*の側鎖にフレキシビリティを与えている残基は、これら 2 つのアミノ酸残基の近傍にまで側鎖を伸ばしている Glu116 であると考えられる。この Glu116 側鎖の γ -カルボキシル基は、Lys237*側鎖の ϵ -アミノ基と静電的相互作用をすることで本来固定されている Lys237*側鎖に新たな動きを与え、その結果として Lys237*側鎖がフレキシブルになっていると推定される。また、Cys113 側鎖のダブルコンフォメーションは、Lys237*がフレキシブルになったことで生まれた構造変化であり、新たなコンフォメーション時には Glu116 側鎖の γ -カルボキシル基と相互作用していた。

MGL1 活性部位に存在する水素結合ネットワークは酵素活性で 2 つの役割を担っていると考えられる。第一には PLP のリン酸基 -Arg55*/58*-Tyr108/111 による Tyr108/111 のチロシネートアニオン化である。第二に、活性部位と MGL 分子外の水分子との間でプロトンを運搬する役割である。よって、この水素結合ネットワークは L-メチオニンの γ 脱離反応を効率よく進めるために必要な機構であり、このネットワーク形成が不規則な MGL2 は L-メチオニンに対する活性が低くなっていると考えられる。

7. 他の PLP 依存性酵素 γ -ファミリーとの構造比較

シスタチオニンガンマ合成酵素 CGS は O-スクシニル L-ホモセリンの α , γ -脱離反応と γ 置換反応を触媒する PLP 依存性酵素であり、E. coli CGS は高分解能で構造解析されている (PDB ID: 1CS1, 78)。MGL1/ O-スクシニル L-ホモセリン複合体と MGL2、E. coli CGS を重ね合わせると、Lys234*/Lys237*近傍には E. coli CGS の Arg106 側鎖が位置している。この Arg106 は、基質結合部位に入った O-スクシニル L-ホモセリンの側鎖末端のカルボキシル基と静電的相互作用すると示されており、MGL では Lys234*/Lys237*が同様の働きをしていると推定される。さらに、MGL2 では Lys237*が水素結合で固定されないために、O-スクシニル L-ホモセリンとの相互作用を形成しやすく、その結果、MGL1 より高い活性を示すと考えられる。

他種の MGL では Ser113/Glu116 部分はセリンやアラニンのような非極性で短い側鎖のアミノ酸が位置しており、グルタミン酸を持つ MGL2 は非常にユニークであるといえる。EhMGL1 S113E 変異体では、構造データから変異させたアミノ酸残基は基質と直接相互作用しない位置にあると考えられるにもかかわらず、MGL2 様の活性に変化させることができる。この変異体は特に TFM や O-スクシニル L-ホモセリンにたいする活性を持つことから、L-メチオニンより大型の基質に対する活性に Glu110 が深く関わっていると考えられる。さらに、E. coli CGS の Arg106 は MGL2 の Glu116 に相当する場所に存在することからも、Glu116 周辺環境が L-メチオニンより大型の基質に対する活性に寄与していると推定できる。

8. クリプトスポリジウム AOX 阻害剤の大量合成 合成法を確立した。以下方法を示す。

a. 第一工程

- ・酢酸ゲラニル、エタノールと二酸化セレンを還流下 1 時間 30 分攪拌。
- ・反応液を室温まで冷却した後溶媒を減圧留去。
- ・濃縮物のエタノール溶液に 0℃で水素ホウ化ナトリウムを加えた後、同温で 30 分攪拌。
- ・反応液に 2M 塩酸水溶液を加えた後、水に注ぎ込み酢酸エチルで抽出、再抽出。
- ・有機層に 20%食塩水を加えて洗浄。
- ・有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を