

site-directed mutagenesis 法により 23 種類のミスセンス変異を導入したヒト変異 IDS cDNA 発現ベクターを構築し、それぞれ一過性導入した培養 COS 細胞に対するシャペロン効果を線維芽細胞と同様の方法で測定した。

(2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立

2011 年 1 月から 2012 年 6 月まで国立成育医療研究センターで、在胎週数 35 週以上かつ出生体重 2000 g 以上で出生した新生児を対象とした。現行の先天性代謝異常症マス・スクリーニングのために新生児からろ紙採血をする際、本検査用のろ紙微量血液検体も採取し、1) GAA 活性値(基準値に対する%)、2) 阻害% (阻害物質の存在下、非存在下での活性値の比)、3) Ph 活性比(酵素反応条件による活性値の比)を蛍光合成基質を用いて測定した。GAA 活性値が正常新生児基準値の 20%以下の場合を一次スクリーニング陽性と判断し、二次スクリーニングとして pseudodeficiency の鑑別のために GAA 遺伝子の 1726G>A (G576S) の遺伝子多型解析を行った。遺伝子の多型解析で pseudodeficiency が否定された場合および pseudodeficiency と診断された場合でも GAA 活性値が基準値の 8%以下であった症例については、リンパ球の GAA 活性測定と GAA 遺伝子の全領域の遺伝子検査を行った。

(3) 無血清培地を用いた製造コストが低く安全性の高い酵素製剤の実用化：

IDS KO マウスの骨の病理組織学的評価：37～39 週齢の IDS KO マウス及び IDS KO マウスと同腹仔の野生マウス各 3 匹を用い、軟 X 線写真撮影、病理組織学的検査、骨形態計測を行った。

IDS の薬効評価：IDS を 0.5 mg/kg、1.0 mg/kg 及び 2.0 mg/kg の用量で、15～19 週齢の IDS KO マウスへ週 1 回 24 週間反復尾静脈内投与した(1 群 4 匹)。投与媒体を週 1 回 24 週間反復投与した IDS KO マウスを病態対照群、また IDS KO マウスと同腹仔の野生型マウスを正常対照群として設定した。治療効果は、尿中および臓器内

(肝臓、心臓、腎臓、脾臓、肺、脳、大腿筋及び舌)の GAG 濃度および病理組織学的変化で評価した。

(倫理面への配慮)

(1) 中枢神経病変に対する治療法の開発：ヒト検体については、鳥取大学医学部倫理委員会の承認を受け、厚生労働省のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する規定を遵守し行う。遺伝子組換え実験は、鳥取大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受けて実施した。

(2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立：本研究では、あらかじめ本研究の主旨、方法、メリット、デメリット等を保護者に説明し、書面で同意が得られた新生児のみを対象とした。遺伝子多型解析を行う場合は再度、検査の説明および同委の取得を行った。

(3) 無血清培地を用いた製造コストが低く安全性の高い酵素製剤の実用化：動物実験については、「動物の愛護及び管理に関する法律」などを遵守し、倫理観点から適正な実験動物の飼育と動物実験を実施した。また、日本ケミカルリサーチ株式会社が定める動物実験倫理規定に基づき設定された「動物実験倫理委員会」での承認を受け実施した。

### C. 研究結果

(1) 中枢神経病変に対する治療法の開発：ヒト IDS 酵素蛋白質を試験管内で 70 度 0, 10, 20, 30 分間インキュベートすると、蛋白質熱変成により疎水部位に特異的に結合し蛍光を発する PSA dye による蛍光量が時間依存的に増加した。これに対し、各候補化合物の効果を調べた結果、FDA 認可薬化合物 7 化合物、ICCB 化合物 14 個のうち 11 個の化合物において濃度依存的に有意に PSA 蛍光量の低下作用を示し、熱変成に対する IDS 酵素安定化作用を認めた。R110M 変異をもつ MPSII 線維芽細胞に対するシャペロン試験の結果、FDA 7 化合物のうち 5 化合物において有意な酵素活性上昇効果(シャペロン効果)を認めた。

さらに、そのうちの2化合物(IDS-F3とIDS-F5)について変異IDS発現細胞系に対するシャペロン効果を調べた結果、IDS-F3は15変異に対し、IDS-F5は7変異に対し、有意なシャペロン効果を示した。

(2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立:1115名が検査を受け、そのうち24名が一次スクリーニング陽性と診断された。これらの陽性例の1726G>A(G576S)のGAA遺伝子多型解析を行った結果、22名はpseudodeficiencyに矛盾しないホモ接合体であった(対象者の1.97%)。2名はヘテロ接合体であったため、GAA遺伝子検査を行ったところ、GAA遺伝子変異は認められなかった。スクリーニング陽性群の解析結果の平均値は、1)GAA活性値 $15.2\pm 4.6\%$ 、2)阻害% $52.5\pm 10.2\%$ 、3)pH活性比 $22.0\pm 12.6$ であった。スクリーニング陰性群では、1)GAA活性 $98.5\pm 41.6\%$ 、2)阻害% $56.1\pm 9.5\%$ 、3)pH活性比 $10.2\pm 2.7$ であった。GAA活性値が8%以下、阻害%60%以上、pH活性比30倍以上を呈するポンペ病症例はなかった。

(3) 無血清培地を用いた製造コストが低く安全性の高い酵素製剤の実用化:

#### IDS KOマウスの骨の病理組織学的評価

##### 1) 軟X線写真

野生型マウス群と比較してIDS KOマウス群において、頭蓋骨、上肢、下肢及び肋骨等で骨の肥厚化が認められた。

##### 2) 病理組織学的検査

野生型マウス群と比較して、IDS KOマウス群において皮質骨部分が肥厚化していた。また、空胞化した骨小腔が多数認められ、骨細胞の密度も野生型マウス群と比較して増加していた。

##### 3) 骨形態計測

単位骨量(%)、骨梁幅( $\mu\text{m}$ )、骨梁数(/mm)及び骨梁間隙( $\mu\text{m}$ )は野生型マウス群でそれぞれ、 $10.2\pm 2.3$ 、 $41.5\pm 5.0$ 、 $2.45\pm 0.28$ 及び $370.6\pm 49.8$ であった。一方、IDS KOマウス群ではそれぞれ、 $17.1\pm 1.8$ 、 $45.2\pm 1.8$ 、 $3.79\pm 0.34$ 及

び $220.3\pm 25.4$ であった。野生型マウス群と比較して、IDS KOマウス群で単位骨量及び骨梁数の有意な増加、骨梁間隙の有意な減少が認められた。骨梁幅については、野生型マウス群とIDS KOマウス群で差は認められなかった。

#### IDSの薬効評価試験

IDSをIDS KOマウスへ0.5 mg/kg、1.0 mg/kg及び2.0 mg/kgの用量で、週1回24週間反復尾静脈内投与した。その結果、尿中GAG濃度は、初回測定時点の投与4週から顕著に減少し、投与期間中野生型群の尿中GAGレベルに近い濃度で推移した。組織中のGAG濃度は、脳以外の組織において、顕著に減少し、いずれの投与群においても病態対照群と比較して有意なGAG濃度の減少効果が認められた。

#### IDSの病理組織学的薬効評価試験

IDSをIDS KOマウスへ0.5 mg/kgの用量で、週1回16週間反復尾静脈内投与したのち、肝臓、脾臓及び心臓についてHE染色標本及びAlcian Blue染色標本を作製し、病理組織学的検査を実施した。その結果、HE染色標本においては、野生型群と比較して病態対照群で肝細胞、肝臓のクッパー細胞、脾臓の血管内皮細胞の肥大化及び肝細胞の空胞化が認められた。これら病態対照群で認められた病理所見に関し、IDS投与により改善効果が認められた。また、Alcian Blue染色標本においては、野生型群と比較して病態対照群で、肝臓の血管内皮細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞、脾臓の血管内皮細胞、間質結合組織、心臓の血管内皮細胞において、強い染色性が認められた。これら、病態対照群で強い染色性が認められた部位について、IDS投与によりその染色性の低下が認められた。

#### D. 考察

##### (1) 中枢神経病変に対する治療法の開発:

現在、ライソゾーム病に対するケミカルシャペロンの定義は、一部のアロステリック効果を示す化合物を除き、1)試験管内酵素基質競合阻

害活性、2) 試験管内酵素安定化効果、を示すものを言う。今回、試験管内阻害活性を示す 21 候補化合物のうち 18 化合物で酵素安定化効果が見られたことから、これらの化合物は少なくともヒト IDS に対するケミカルシャペロンであることが示された。一方、患者細胞に対するシャペロン効果の検討から、FDA 認可薬 5 化合物が有効性を示し、さらにそのうち 2 化合物で変異特異的シャペロン効果を認めたことから、MPSII に対する有望な候補化合物である可能性を示唆した。また、これらの化合物は FDA 認可薬化合物であることから、将来的にオフラベル適応による早期の臨床応用が期待される。

今後、ICCB 化合物についても同様の検討を行い、また、より多くの変異 IDS 発現細胞系に対するシャペロン効果の検討を行う必要がある。また、ヒト IDS 酵素蛋白質立体構造との結合解析を行うことで、化合物と酵素の結合様態を明らかにすることができると考える。一方、シャペロン化合物は正常酵素に対する安定化作用を示すことから、酵素補充療法との併用効果が注目されている。今後は、モデルマウス投与実験により、酵素補充療法との併用や脳病変への効果について検討を行う予定である。

(2) 乾燥ろ紙血等を用いた迅速スクリーニング法の確立：

今回の結果では一次スクリーニング陽性と判定された 24 名のうち 22 名が pseudodeficiency であった。本研究における pseudodeficiency の頻度は 1.97% であり、パイロットスタディの 3.9% と比較すると半分以下に減少し、偽陽性例が減少した。また 2 例は、GAA 遺伝子の多型解析により pseudodeficiency が否定されたため、二次スクリーニングであるリンパ球 GAA 活性測定、GAA 遺伝子検査を行ったが、異常は認められなかったため、正常と判断した。乳児型ポンペ病患者が疑われる症例は認めなかった。この結果、本ポンペ病新生児スクリーニングの特異度は 97.3% であり、パイロットスタディの 95.8% と比

較して特異度も改善した。これはパイロットスタディ時には GAA 活性値(基準値に対する%)を 30% 以下を陽性としていたが、今回のスクリーニングでは 20% 以下としたため、偽陽性例が減少したと考えられる。

(3) 無血清培地を用いた製造コストが低く安全性の高い酵素製剤の実用化：

IDS KO マウスにおける骨異常に関する評価を実施したところ、IDS KO マウスにおいて軟 X 線写真の所見及び病理組織学的検査の所見で、骨の肥厚化が認められ、また、骨形態計測の結果では、骨梁の増加が認められた。少数例での検討であるため、引き続き詳細な検討が必要ではあるものの、IDS KO マウスにおいて、何らかの原因により骨異常が引き起こされている可能性が示唆された。

一方で、日本ケミカルリサーチ株式会社が開発を行っている IDS 酵素製剤の有効性を IDS KO マウスを用い評価するため、IDS を IDS KO マウスへ 0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg の用量で週 1 回 24 週間反復尾静脈内投与したところ、全ての用量において、尿中及び組織中 GAG 濃度の顕著な減少効果が認められた。唯一、脳については、いずれの用量においても GAG 減少効果は認められなかった。IDS はタンパク製剤であり、静脈内投与した場合、血液脳関門を通過することができないため、脳に対しては GAG 減少効果を示さなかったと考えられる。

また、IDS を IDS KO マウスへ 0.5 mg/kg の用量で週 1 回 16 週間反復尾静脈内投与したところ、病態対照群で認められる病理所見に対し改善効果が認められた。さらに Alicant Blue 染色において、病態対照群と比較し IDS 投与群でその染色性が低下しており、IDS の臓器中 GAG 濃度減少効果が病理組織学的にも確認された。

## E. 結論

試験管内活性試験と培養細胞に対する効果の検討により、FDA 認可薬化合物 2 個が MPSII に対

する有効なケミカルシャペロン化合物であることが分かった。1115名が対象となった今回のポンペ病新生児マス・スクリーニングでは一次スクリーニング陽性例は24例であり、22例は pseudodeficiency であった。2例は疑陽性であったが、乳児型ポンペ病患者が疑われる症例はなかった。検査の特異度は97.3%とパイロットスタディよりも精度が増した。IDSをIDS KOマウスへ投与しその薬効を検証したところ、尿中及び組織中における顕著なGAG減少効果が認められ、また、病理組織学的にも、IDSの投与により、IDS KOマウスで認められる病理所見に対する改善効果が認められた。以上のことより、IDS酵素製剤としての有効性が確認された。

F. 健康危険情報 本研究から得られる知見のなかに、該当する情報は含まれていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K: Therapeutic chaperone effect of *N*-octyl 4-epi- $\alpha$ -valienamine on murine  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Mol Genet Metab.* 106:92-98, 2012.

2) Aguilar-Moncayo M, Takai T, Higaki K, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Li L, Yu Y, Ninomiya H, García-Moreno I, Ishii S, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Suzuki Y: Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: Pharmacological chaperones for Fabry disease and  $G_{M1}$  gangliosidosis, *Chem Commun* 48:6514-6516, 2012.

3) Luan Z, Li Linjing, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y, Ohno K: The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice. *Brain Dev*, 35: 317-322, 2012.

4) Castilla J, Riquez R. Cruz D, Higaki K, Nanba E, Ohno K, Suzuki Y, Diaz Y, Ortiz Mellet C, Carcia Fernandez JM, Castillon S: Conformationally-locked N-glycosides with selective  $\beta$ -glucosidase inhibitory activity: Identification of a new non-iminosugar-type pharmacological chaperone for Gaucher disease. *J Med Chem* 55:6857-6865, 2012.

5) Takai T, Higaki K, Aguilar-Moncayo M, Mena-Barragán T, Hirano Y, Yura K, Yu L, Ninomiya H, M. García-Moreno I, Sakakibara Y, Ohno K, Nanba E, Ortiz Mellet C, José M. Fernández G, Suzuki Y: A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for  $G_{M1}$ -gangliosidosis. *Mol Ther*, 21:526-532, 2013.

### 2. 学会発表

1) 小須賀基通、木田和宏、藤 直子、開山麻美、五十嵐仁美、後藤由紀、柿島裕樹、奥山虎之。国立成育医療研究センターにおける乳児型ポンペ病新生児マススクリーニング、第54回日本先天代謝異常学会、岐阜、平成24年11月15日-17日、2012.

2) 小須賀基通、木田和宏、藤 直子、開山麻美、五十嵐仁美、後藤由紀、柿島裕樹、奥山虎之。国立成育医療研究センターにおけるポンペ病ハイリスクスクリーニング、第54回日本先天代謝異常学会、岐阜、平成24年11月15日-17日、2012.

3) Takai T, Higaki K, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: A novel chaperone compound for  $G_{M1}$ -gangliosidosis. 第17回日本ライソゾーム病研究会、東京、2012. 10. 5-6.

4) Yu Y, Higaki K, Takai T, Ortiz Mellet C, García Fernández JM, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: pharmacological

chaperones for Fabry disease and  
GM1-gangliosidosis. 第17回ライソゾーム病研  
究会、東京、2012.10.5-6.

5) 難波栄二, 檜垣克美, 高井知子, Yu Yi, 大  
野耕策, 鈴木義之: ファブリー病ならびに GM1-  
ガングリオシドーシスに対する新しいシャペロ  
ン治療薬の開発. 第57回日本人類遺伝学会、東  
京、2012.10.24-27.

6) 高井知子, 檜垣克美, Ortiz Mellet C,  
García Fernández JM, 大野耕策, 鈴木義之, 難  
波栄二: ヒト I51T 変異・-ガラクトシダーゼに  
有効な新規ケミカルシャペロン化合物の解析.  
第54回日本先天代謝異常学会、岐阜、  
2012.11.15-17.

H. 知的財産の出願登録  
なし。

# エイズ日和見原虫症に対する新規薬剤標的の探索と生理機能の解明

国立感染症研究所・寄生動物部  
野崎 智義

研究要旨 本研究はエイズに伴う重要な原虫感染症であるトキソプラズマ症・クリプトスポリジウム症・赤痢アメーバ症の新規創薬に不可欠である新規創薬標的の探索、その代謝経路の同定と機能解明、阻害剤スクリーニングによるリード化合物の獲得を目的としている。2年度は、赤痢アメーバ創薬に関しては、標的であるシステイン・S-メチルシステインの生合成経路の生理機能を解明した。更に、微生物抽出液から本経路を阻害する阻害剤を多く発見し、一部の阻害剤の構造を決定した。トキソプラズマおよびコクシジウム関連原虫における植物ホルモン、阻害剤の増殖抑制効果の評価を終え、数種類の有望な阻害剤を同定した。クリプトスポリジウム症に対する創薬では、標的となる NADH-ユビキノン還元酵素の大腸菌での組換え酵素の発現・調整に成功した。以上のように、いずれの分野に関してもほぼ予定通りに計画を実施し、最終年度の研究展開に必要な成果を挙げた。

## 研究分担者

- (1) 国立感染症研究所・寄生動物部 永宗喜三郎
- (2) 北里大学・大学院感染制御科学府 塩見和朗
- (3) 弘前大学・農学生命科学部 坂元君年
- (4) (一財) 日本生物科学研究所 川原史也

## A. 研究目的

HIV/AIDSにしばしば随伴するクリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、赤痢アメーバ症などの原虫症は日和見感染症として重要である。これらの原虫感染症の治療・予防法は、極めて限定的であり、HIV感染において十分な治療効果をもつ治療法が存在しないか、治療法が存在しても、治療薬が少ない、薬剤耐性が存在する等の問題が存在する。マラリア・リーシュマニア等の例に限らず、原虫の薬剤耐性株の出現は、原虫感染症に共通した問題であり、持続的にモニターし続けるべき重要な課題である。更に、現行のエイズ多剤併用療法への薬剤耐性出現に鑑み、日和見原虫症に有効な新規薬剤を準備しておくことは極めて重要である。

本研究は、HIV/AIDSに伴うクリプトスポリジウム症、トキソプラズマ症、赤痢アメーバ症などの原虫症に対する治療・予防薬の創成を目指し、原虫に選択的に存在する代謝経路を標的とした新規阻害剤の探索、標的代謝経路の生理機能の解明を行い、リード化合物の誘導体化、候補化合物の選定、並びに、得られた化合物の安全性試験を行うことを短、中期的目的としている。具体的な創薬実現をめざし、本研究班では微生物の抽出液から抗生物質を単離する天然物化学・有機化学の専門家、寄生虫生化学を専門とする寄生虫学者、創薬・ワクチンを専門とする企業の研究者という異分野の結集により総合的な創薬研究を展開している。

トキソプラズマ症創薬に関しては、コクシジウム綱原虫に選択的に存在する植物ホルモン生合

成・代謝経路を阻害する薬剤を既存の薬物群の中から探索し、インビトロ・インビボ試験により最適化合物を選択し、抗トキソプラズマリード化合物を決定しようとしている。赤痢アメーバ症創薬に関しては、システイン・S-メチルシステイン生合成経路の主要酵素システイン合成酵素(CS)とセリンアセチル転移酵素(SAT)を標的として、糸状菌・放線菌の培養液上清から阻害剤のスクリーニングし、構造を決定し、リード化合物を獲得することを目指している。同時に、標的酵素・代謝経路の生理機能を明らかにし、代謝の俯瞰的解析により、代謝全体における役割を解明する。クリプトスポリジウム症創薬に関しては、特徴的な呼吸鎖の重要な作用点であるNADH-ユビキノン還元酵素(ND2)を標的としたスクリーニング・創薬を行うことを目標としている。二年度はHIV/AIDSに随伴するこれらの重要な原虫症の創薬に関して、年次計画に基づき研究を実施した。

## B. 研究方法

### 1. トキソプラズマ等コクシジウム創薬研究

本実験で用いた植物ホルモンは全てシグマ社から購入した。宿主細胞内で活発に増殖を行うステージであるタキゾイト期に特異的に発現する遺伝子である SAG1 プロモーターの下流に DsRed を、ブラディゾイト期に特異的に発現する遺伝子である BAG1 の下流に GFP を組み込んで、両ステージで異なった蛍光を発するよう設計されたトキソプラズマ株、PLK/DUAL を用いてスクリーニングを行った。タキゾイトからブラディゾイトへの分化誘導は通常培養培地から RPMI1640 培地 (1 % FBS, 50 mM HEPES, 0.1 % Gentamicin をそれぞれ添加, pH 8.1) に培地を交換し、通常大気中で 7 日間培養することによって行った。分化したブラディゾイトにさまざまな植物ホルモンや阻害剤を 100  $\mu$ M 添加し、48

時間後に蛍光顕微鏡観察を行った。スクリーニングによって顕著な差が認められたものに関しては再現性およびより低濃度での効果を確認した。

抗コクシジア薬のスクリーニングのモデル原虫として鶏アイメリア原虫 *Eimeria* spp. (*Eimeria brunetti* もしくは *Eimeria tenella*) のオーシストを使用した。このオーシストの継代およびオーシストを用いた感染実験には、3~5 週齢の実験用白色レグホン SPF 鶏 L-M 系 (日生研株式会社) を供試した。オーシストの継代および感染実験の終了時には炭酸ガスを用いて鶏を安楽殺させた。感染は液体窒素中で凍結保存された鶏アイメリア原虫のスपोシスト浮遊液を急速解凍後、PBS で 2~3 倍に増量し、約 1 日間絶食させた鶏に 0.5mL ずつ経口投与した。5~8 日目の糞便を採集し、オーシストを濾過・濃縮・収集した。収集したオーシストを 10~20 倍量の 1v/v% 硫酸に浮遊させ、浮遊液中に電動エアポンプで送気しつつ 28°C の恒温槽内で 3~6 日間加温処理してオーシストを孢子形成させた。孢子形成オーシストは 2~5°C に保存して休眠状態においた。以後、上記したスपोシスト浮遊液を用いた継代法と同様にオーシストを鶏に投与して維持した。継代時のオーシスト投与数は、鶏 1 羽当たり  $1 \times 10^4$  個とした。継代は少なくとも 6 ヶ月毎に実施して、試験に供試するオーシストを更新した。

オーシストを用いた感染実験および薬剤の評価には 1 群あたり 5~10 羽の鶏を使用し、薬剤を投与しない非投薬感染対照群も設けた。薬剤は剤形に合わせて飼料もしくは飲水中に 1,000ppm (0.1%) の濃度で混合して投与した。薬剤投与後 2 日以降に冷蔵保存していた鶏アイメリア原虫のオーシストを 1 羽あたり  $1 \times 10^5$  個を鶏に経口投与して感染させた。オーシスト投与後 7 日目に試験を終了した。感染開始日と試験終了日に個体別に体重を測定し、期間中の増体率を算出した。成績の集計時には、非投薬攻撃対照群の増体率を 100% とし、それに対する投薬群の増体率を相対値で表した。糞便中に排出された新生オーシストの数を定量した。増体率の改善、新生オーシスト排出数の抑制を指標にして投薬群と非投薬感染対照群の成績を比較し、供試した薬剤の有効性を評価した。2,4-D, グリフォサート, カイネチン, チジアズロン, 塩化クロロコリン, ジベレリン酸, ナフタレン酢酸, パクロブトラゾール, プロクロラズ, ビテルタノール, ポリオキシシンをテストした。

## 2. クリプトスポリジウム創薬研究

*C. parvum* 由来 NADH-ユビキノン還元酵素 ND2 またはリンゴ酸-キノン酸化還元酵素 MQO 遺伝子を導入した方向性 TOPO ベクター pET151 を発現用大腸菌 BL21 STAR (DE3) に導入し、IPTG 誘導によるタンパク質発現の検討、活性測定法の検討を行った。ND2 についてはさらに膜からの可溶化、およびアフィニティー樹脂による精製を試

みた。

## 3. 赤痢アメーバ創薬研究

システインと S-メチルシステインの生合成に関与することが示された CS1, CS3, SAT1, SAT2, SAT3 (Nozaki Mol Biochem Parasitol 1998; Nozaki J Biol Chem 1999; Hussain Mol Biochem Parasitol 2009) に関して、psAP-Gunma (Mi-ichi Proc Natl Acad Sci USA, 2009) とリポソームを用いた形質転換 (Nozaki, J Biol Chem 1999) により初年度作成した遺伝子発現抑制体を用いて、形質転換発現抑制体の表現型の解析を行った。6 ml Pyrex tube 或いは 12 穴プレートを用いて、赤痢アメーバ形質転換体およびコントロール株の増殖を経時的に観察した。12 穴プレートを用いる際には Anerocult A により嫌気性条件を維持した。増殖の計測は BI-S-33 培地を改変し、8 mM の L-cysteine の存在下、非存在下で行った。培養液中の L-cysteine は、グルタチオンを保たない赤痢アメーバにとって主要なチオール化合物であり抗酸化物質として機能することが知られている。

微生物代謝産物ライブラリーのスクリーニングに必要な含硫アミノ酸代謝に関与する大腸菌組換え酵素 (SAT1~3, CS1~3) の調製は分担報告書に従った。96 穴プレートでの酵素アッセイ系の詳細は分担研究方向所に記述した。北里大学北里生命科学研究所微生物資源センターおよび微生物機能研究室より供給された糸状菌および放線菌の培養液をそれぞれ 1 ウェルあたり 10  $\mu$ L 用いて、CS1, CS3 および SAT1, SAT3 に対する阻害活性を測定した。SAT を阻害する微生物培養液の一次スクリーニングでは、SAT の活性を 50% 以上阻害し、かつカップリング反応に用いている CS1 を阻害しないもの (CS1 阻害率 25% 以下) を選択した。CS を阻害する微生物培養液の一次スクリーニングでは CS の活性を 70% 以上阻害するものを選択した。二次スクリーニングでは、システインを検出するための酸ニンヒドリン反応を阻害して偽活性を示すサンプルを除いた。

スクリーニングで阻害活性を見出した微生物培養液の生産菌 (糸状菌または放線菌) を種培養し、それを各々の化合物生産に適した培地に植菌し生産培養を行った。得られた微生物培養液に EtOH を添加して菌体からも代謝産物を抽出・濃縮後、各種カラムクロマトグラフィーで酵素阻害活性を指標に精製を進め、活性化合物を単離した。放線菌 K11-0471 株、*Streptomyces* sp. K11-0660 株、糸状菌 *Penicillium* sp. if08054 株からの活性物質の精製の詳細は分担研究報告書に詳述した。

(倫理面への配慮)

病原微生物取り扱いに関する細則には十分に配慮した。マウス感染実験に関しては機関内の動物実験委員会の承認を得て、内規を遵守して

行った。更に、動物実験に関しては「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律について」(環境省)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省)、「厚生労働省の所轄する実験機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(厚生労働省)、「農林水産省の所轄する実験機関における動物実験等の実施に関する基本指針」(農林水産省)、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議)などを厳正に遵守した。

### C. 研究結果

#### 1. 天然・合成植物ホルモンのトキソプラズマ増殖に対する評価

本年度はトキソプラズマの生活環において、シスト壁内に隠れ宿主が死亡するまで宿主体内に潜んでいるステージであるブラディゾイトに対して、植物ホルモンやその阻害剤、農薬など 28 種類の薬剤をスクリーニングした。その結果、トキソプラズマの両ステージに対して有効な 2 種の薬剤(プロピコナゾールおよびビテルタノール)を見出すことができた。両薬剤は急増虫体、緩徐虫体、シスト化虫体のいずれの形成も阻害した。

#### 2. アピコンプレクサ門原虫に対する抗植物ホルモン薬剤効果の検討

2,4-D、グリフォサートおよびカイネチンの鶏の増体率の成績では、非投薬感染対照群と比較した時にグリフォサート投与群が 108.8%の相対値を示して上回り、感染および発症抑制効果を示す良好な成績であった。一方、カイネチン投与群は非投薬感染対照群とほぼ同等、2,4-D 投与群は非投薬感染対照群を大きく下回る成績であった。糞便中に排出された新生オーシストの数は、グリフォサートおよびカイネチン投与群で非投薬感染対照群の 75.3%および 50.4%とオーシスト排出の抑制効果が確認された。一方、2,4-D 投与群は非投薬感染対照群の成績を上回り、オーシストの排出抑制効果は認められなかった。

チジアズロン投与群における糞便中オーシスト数は非投薬感染対照群と比較して 74.5%の値を示し、オーシスト排出の抑制効果が確認された。塩化クロロコリン、ジベレリン酸およびナフタレン酢酸投与群における糞便中オーシスト数は非投薬感染対照群と比較して、それぞれ 52.2、41.2 および 37.0%の値を示し、全ての投薬群でオーシスト排出の抑制効果が確認された。

パクロブトラゾール投与群の糞便中オーシスト数は非投薬感染対照群と比較してほぼ同等の 94%であり、オーシストの排出抑制効果は認められなかった。プロクロラズ、ビテルタノールおよびポリオキシンの鶏の増体率の成績では、ビテルタノール投与群は非投薬感染対照群を大きく下回る成績であった他概ね良好であった。ポリオキシンの投与群における糞便中オーシスト

数は非投薬感染対照群と比較して 69.1%の値を示し、オーシスト排出の抑制効果が確認された。一方、プロクロラズおよびビテルタノール投与群の糞便中オーシスト数は非投薬感染対照群と比較して、それぞれ 101.8%および 101.6%であり、オーシストの排出抑制効果は認められなかった。

#### 3. クリプトスポリジウムの創薬研究

昨年度までに終了した *C. parvum* の ND2 および MQO 発現ベクターを用いた大腸菌での発現の検討を行った。発現については大腸菌の培養温度、IPTG の濃度、IPTG の添加時期それぞれについて、30-37°C、0-300 mM、大腸菌の OD=0.3-1.0 の範囲で条件検討を行った。ND2 は IPTG 無添加以外のいずれの条件においても SDS-PAGE で強いバンドが確認できるほど高発現された。ND2 は膜表在性タンパク質であることから、酵素活性を維持した状態での発現には大腸菌の内膜に結合していることが期待されるため、発現誘導を行った大腸菌を破碎後、可溶性画分、内膜、外膜に分離した。SDS-PAGE により発現された ND2 のほとんどが内膜画分に局在していることが確認された。本実験で発現宿主に使用した大腸菌は内在性の NADH 脱水素酵素遺伝子を破壊していないため、内在性 NADH-ユビキノン酸化還元活性と発現した ND2 活性の総和が観測されるはずである。SDS-PAGE で誘導タンパク質が見えない非誘導培養と誘導培養の大腸菌から得た内膜を用いて目的の活性を比較したところ、非誘導培養で 1.4 $\mu$ mol/min/mg であったのに対し、誘導培養ではおよそ 1.5 倍の 2.3 $\mu$ mol/min/mg という比活性を与え、機能的に発現していることを確認し、スクリーニングに供与するのに十分な活性であることが分かった。発現した ND2 を精製するために Triton X-100 またはドデシルマルトシドにより膜からの可溶化を行ったところ、いずれの場合でも界面活性剤濃度 0.5%にて容易に可溶化された。

一方、MQO の発現誘導培養では、大腸菌を外膜、内膜、可溶性画分に分画した後においても、いずれの画分にも顕著なタンパク質発現が確認できなかった。内膜を用いた活性測定でもリンゴ酸-ユビキノン酸化還元活性は検出できず、他の発現方法を検討する必要が出てきた。そこで、発現の困難なタンパク質について最近発現に成功した報告の多い、pET-SUMO ベクターによる発現を検討することにした。pET-SUMO ベクターは T ベクターとして市販されているため、TA クローニングにより目的のプラスミドを構築した。

#### 4. 赤痢アメーバのシステイン・S-メチルシステイン合成経路に関与する SAT, CS の発現抑制体の表現型の解析

SAT はシステイン並びに S-メチルシステインの合成経路において、セリンとアセチル補酵素 A



から O アセチルセリンを生成する反応を触媒する。CS は最終段階において、硫化水素、またはメタンチオールと O アセチルセリンとからそれぞれ最終産物を生成する反応を触媒する。SAT は 1-3 の 3 種のアイソタイプで構成され、SAT1 vs SAT2 は 73% の SAT1/2 と SAT3 は 48% のアミノ酸同一性を示した。一方 CS は相互同一性は 83-99% であった。CS1/2 は対立 (allelic) 遺伝子である。

SAT1 又は SAT2 遺伝子の gene silence による発現抑制では、SAT1, 2 の発現が同時に抑制された。一方、SAT3 遺伝子の抑制株では SAT3 遺伝子のみが発現抑制された。一方、CS に関しては CS1-3 が同時に抑圧される株のみが作成できた。これらの発現抑制体のインビトロでの増殖を通常の BI-S-33 培地内で観察した。コントロールと SAT1/2, SAT3, CS1-3 抑制株での増殖に相違はなかった。一方システインを含まない培地では、SAT3 抑制株において軽微な、CS1-3 抑制株において重度の増殖抑制が見られた。この結果は SAT1/2 と SAT3 とで機能的な棲み分けがあることが、更に、CS がシステイン飢餓下での赤痢アメーバ栄養型の増殖に必須であることが示された。

#### 5. 天然化合物ライブラリーからの赤痢アメーバ CS の阻害剤探索、構造活性相関の解明

前年度天然化合物ライブラリーから CS 阻害化合物として見出した naphthacemycin A<sub>9</sub> のヒドロキシ基に、種々の置換基を導入した 23 化合物の CS1 および CS3 阻害活性を評価した。Naphthacemycin A<sub>9</sub> の CS1 阻害活性が IC<sub>50</sub>=19.4 μM であるのに対し、3 位にアミドを導入した化合物 A<sub>9</sub>-1 と、L-プロリンを導入した化合物 A<sub>9</sub>-2 は CS1 阻害活性が上昇し、それぞれ IC<sub>50</sub>=1.3 μM, 6.5 μM であった。D-プロリンを導入した化合物 A<sub>9</sub>-3 の CS1 阻害活性は L 体に比べ弱く、IC<sub>50</sub>=49 μM であった。トシル基で置換されている化合物や、ブトキシカルボニル基を持つ置換基で置換されている化合物は阻害活性が低下する傾向がみられた。また、3 位に加え 1 位にも保護基を導入した化合物は阻害活性を示さなかった。

Naphthacemycin A<sub>9</sub> は CS3 阻害活性を 150 μM で示さなかったが、A<sub>9</sub>-1 (IC<sub>50</sub>=58.3 μM) と A<sub>9</sub>-2 (IC<sub>50</sub>=65.4 μM)、メチル基を導入した A<sub>9</sub>-4 (IC<sub>50</sub>=66.2 μM) では活性を確認できた。

#### 6. 赤痢アメーバの微生物培養液からの SAT, CS の阻害剤活性スクリーニング

本年度は SAT1 と SAT3 と、CS1 と CS3 を選択的に阻害する微生物培養液約 6,700 種類をスクリーニングした。SAT, CS とともに、アイソザイム選択的に阻害する微生物培養液が見出された。また、(1) 放線菌培養液に比べ、糸状菌培養液からより多くの阻害サンプルを見出した、(2) SAT3 阻害を示す糸状菌サンプルが非常に多かった、(3) SAT, CS とともに、アイソザイム非選択的に阻害するサンプル数より選択的に阻害

するもののほうが多い、という傾向がみられた。

#### 7. 放線菌・糸状菌培養液からの赤痢アメーバ CS 阻害化合物の単離

スクリーニングにより阻害活性を見出した微生物培養液のうち、本年度は 10 種の糸状菌または放線菌を大量培養し、培養液中に含まれる阻害化合物を各種カラムクロマトグラフィーで精製した。そのうち、放線菌 K11-0471 株、*Streptomyces* sp. K11-0660 株、糸状菌 *Penicillium* sp. if08054 株、同 if08064 株の培養液から CS 阻害化合物を単離した。

放線菌 K11-0471 株が生産する CS1 阻害活性を示す赤色の K11-0471-1 化合物を 4.0 mg 単離した。K11-0471-1 化合物は FABMS, ESIMS 測定の結果、分子量 539、分子式 C<sub>24</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> と推定された。各種 NMR スペクトルより、ナフトキノン骨格を持つことが示唆されたが、4 級炭素が多く構造決定には至らなかった。これらの結果をもとにデータベース検索を行ったが既知化合物に一致するものはなく、新規化合物であると考えられた。K11-0471-1 化合物の CS1 阻害活性は IC<sub>50</sub>=18.6 μM であった。

放線菌 *Streptomyces* sp. K11-0660 株が生産する阻害化合物 K11-0660-1 および K11-0660-2 化合物を CS1 阻害化合物として各々 17 mg, 8.0 mg 単離した。これら二つの化合物は 215 nm と 271 nm に UV スペクトルの極大吸収を持ち、類縁化合物であると推定された。K11-0660-1 化合物の分子量は ESI-MS スペクトルより 368 であり、各種 NMR スペクトルの解析結果と合わせてデータベース検索を行った結果、3-alkanoyl-5-hydroxy-methyltetronic acid に類似の構造を持つ化合物だと考えられた。K11-0660-1 および K11-0660-2 化合物は共に、CS1 に対する阻害活性が IC<sub>50</sub>=20 μg/mL (分子量 368 で計算すると約 54 μM) であった。

糸状菌 *Penicillium* sp. if08054 株、同 if08064 株培養液から CS1 阻害化合物として得られた化合物はともに、各種機器分析の結果 xanthofulvin (*J. Antibiot.* 2003, **56**, 610) と同定された。Xanthofulvin の CS1 阻害活性は IC<sub>50</sub>=1.7 μM であり、これまで測定を行った天然化合物の中で最も強く CS1 を阻害した。CS3 に対する阻害活性は IC<sub>50</sub>=24 μM であり、CS1 に対しより選択的な阻害を示すことがわかった。

#### D. 考察

HIV/AIDS に付随する原虫症の治療薬に関しては、有効な治療薬が存在しない、少ない、有効性が低いなどの問題が存在する。そこで本研究班は、HIV/AIDS 随伴原虫症薬の開発に資する標的代謝経路、酵素のスクリーニングとその生理機能の解析を目的として、異なった研究背景を有する研究者が指している。初年度から 2 年度まで、当初の計画に従いほぼ予定通りの成果を収めた。特に赤痢アメーバの新規創薬に関しては比較的順調に、新規創薬が展開している。

野崎らの赤痢アメーバのシステイン・S-メチルシステインの生合成経路の生理的役割の解明に関しては、初年度に作成された遺伝子抑圧株を利用した解析により、システイン飢餓下での増殖抑制が観察され、酸化ストレス下での必須性が示され、本経路、その関連酵素(CSおよびSAT)が選択的・合理的な創薬標的であることが異口同音に示された。最終年度は更に、CS, SAT発現抑制形質転換体を用いたメタボローム解析により代謝における本経路の役割を俯瞰的に理解したい。

更に塩見らのCS, SAT阻害剤のスクリーニングは順調にヒット化合物を選択しており、既知の化合物ライブラリーからも、糸状菌・放線菌の培養液中からも、CS, SATそれぞれのアイソタイプに独立した阻害物質、CS, SATのいずれものアイソタイプに共通して阻害作用を示す物質を発見している。天然物ライブラリーから発見されたCS阻害剤Naphthacemycin A<sub>9</sub>および糸状菌培養液上清から精製されたCS阻害剤Xanthofulvinはいずれも既知の化合物であったが、今後赤痢アメーバ細胞に対する効果、動物感染実験での治療効果などを検証する必要があるかもしれない。しかしながら、現状ではより阻害効果の高い阻害剤をスクリーニングし、化合物の構造を同定する方に重きをおく予定である。

トキソプラズマ創薬研究においては、永宗らは、植物ホルモンやその阻害剤、農薬など28種類の薬剤をスクリーニングし、トキソプラズマの急増虫体、緩徐虫体の両ステージに対して有効な2種の薬剤(プロピコナゾールおよびビテルタノール)を同定した。重要な点は両薬剤ともに、急増虫体、緩徐虫体、シスト化虫体のいずれにも有効であったことである。次年度以降、これらの薬剤の作用機序の解明が優先的な研究項目となる。

川原らは、発見された原虫薬シードの安全性の確認を主な目的としているが、これまで実際に安全性を確認するに至った化合物はない。最終年度に、著効の確認されたCS/SATを阻害する抗赤痢アメーバ剤に関して、可能であれば安全性確認実験を行う予定である。同時に、植物ホルモンやその合成経路が原虫薬創薬の合理的標的であることを一般化するために、トキソプラズマ・クリプトスポリジウムらと同様にアピコプラスト門原虫に属するアイメリアを用いた解析を継続した。トリ感染における糞便中排出オーシストの定量により、2,4-D, グリフォサート, カイネチン, チジアズロン, 塩化クロロコリン, ジベレリン酸, ナフタレン酢酸, パクロブトラゾール, プロクロラズ, ビテルタノール, ポリオキシンの治療有効性を確認した。今回、試験に供した11薬剤のうち、アイメリア原虫の投与後に鶏の増体率の改善効果を認めたものは7薬剤であった。また、アイメリア原虫の投与後に糞便中に排出される新生オーシスト数を有意に抑制する効果(非投薬対照群と比較して50%未満の排出数)を認めた薬剤は、ジベレリン酸およびナフタレン酢酸であった。ジベレリン酸とナフタレン酢酸は、顕著な鶏の増体率の改善効果と新生オーシスト数の抑制効果を併せ持つことから、原虫の脱囊期および感染期をターゲットにした創薬

の有望なリード化合物になることが示唆された。

坂元らによるクリプトスポリジウム創薬研究は阻害剤のスクリーニングに供するND2, MQOの組換えタンパク質の大量調整に苦戦し、やや遅れている。最終年度にボトルネックを解決し、これらの酵素の性状解析、阻害剤スクリーニングを終了させたい。

## E. 結論

本研究班が目的とするHIV/AIDSに伴う原虫症(トキソプラズマ・クリプトスポリジウム・赤痢アメーバ)の創薬研究は2年度ほぼ予定通りの成果を挙げた。特に、赤痢アメーバ症の創薬に関して、創薬標的のバリデーション、阻害剤の同定と構造決定などめざましい成果を遂げた。また、トキソプラズマや関連原虫における植物ホルモン・阻害剤の増殖阻害効果の確認、クリプトスポリジウム呼吸酵素の組換え体の作成などに関しても、最終年度の準備として有益な成果を得ることができた。薬剤耐性エイズウイルスの出現に鑑み、本研究の成果によ新規抗原虫薬開発への道が開かれれば、エイズによる致死率を減少させるのに貢献することが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Christy, N., Hencke, J., Escueta-De Cadiz, A., Nazib, F., Thien, H., Yagita, K., Ligaba, S., Haque, R., Nozaki, T., Tannich, E., Herbein, J., and Petri, W. Multi-site performance evaluation of an ELISA for the detection of *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human stool. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1762-1763, 2012.

Nakada-Tsukui, K., Tsuboi, K., Furukawa, A., Yamada, Y., and Nozaki, T. A novel class of cysteine protease receptors that mediate lysosomal transport. *Cell. Microbiol.* 14, 1299-317, 2012.

Jeelani, G., Sato, S., Husain, A., Escueta-de Cadiza, A., Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. *PLoS ONE* 7, e37740, 2012.

Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica* diphosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie.* 94, 1676-1686, 2012.

Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1831, 2012.

- Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544, 2012.
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Novel TPR-containing subunit of TOM complex functions as cytosolic receptor for *Entamoeba* mitochondrial transport. *Scientific Reports* 3, 1129, 2013.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Cysteine protease-binding protein family 6 mediates the trafficking of amylases to phagosomes in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Inf. Immun.* 2013, in press.
- Toyama, T., Tahara, M., Nagamune, K., Arimitsu, K., Hamashima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K. Gibberellin biosynthetic inhibitors make human malaria parasite *Plasmodium falciparum* cells swell and rupture to death. *PLoS ONE* 2012, 7(3), e32246
- 泉山信司、八木田健司、永宗喜三郎 生水と原虫症（生水のリスク） 公衆衛生 2012, 76: 50-53
- 永宗喜三郎 アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモン様物質とその作用 日生研たより 2012, 58: 24-28
- 福士路花、松原立真、永宗喜三郎 *Toxoplasma gondii* 原生動物園 2012, 3: 3-7
- 永宗喜三郎（写真提供、監修） 原生物 151 ~大系統分類から眺める原生物の世界 原生動物園 2012, 3: 41-72
- 喜屋武向子、松原立真、永宗喜三郎 トキソプラズマ症と沖縄県におけるトキソプラズマの流行状況について 防菌防黴 2013, 41: 19-28
- 永宗喜三郎 トキソプラズマ症 IDWR 感染症発生動向調査 感染症週報 2013, 15: 20-25
- Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S., Kita, K. (2012) Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* *The Journal of Biochemistry* 151, 589-592
- Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K., Kita, K. (2013) Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biochemistry* 153, 267-273
- Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S., Kita, K. (2013) Cloning and characterization of hypoxia-inducible factor-1 subunits from *Ascaris suum* - A parasitic nematode highly adapted to changes of oxygen conditions during its life cycle. *Gene* 516, 39-47
2. 学会発表（国際学会及び主要国内学会のみ）
- Nozaki, T. Evolution of function and import machinery of the mitochondria under anaerobic conditions: Highly divergent mitochondrion-related organelles in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. Mito 21012, Heraklion, Greece, May 9-13, 2012.
- Nozaki, T. Mitosomal transport system in *Entamoeba histolytica*. Protist 2012, International Society of Evolutionary Protistology Meeting, Oslo, Norway, July 29-Aug 3, 2012.
- Jeelani, G., Dan, S., Husain, A., Escueta-de Cadiz, Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolome of encystation in *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10-14, 2012.
- Chiba, Y., Dan, S., Makiuchi, T., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Organelle metabolomics of *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10-14, 2012.
- Nozaki, T. Evolution of the mitochondria under anaerobic conditions: Function and import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, Sep 11-14, 2012.
- Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., Furukawa, A., and Marumo, K. A novel class of transporters that mediate lysosomal trafficking in *Entamoeba histolytica*. International Conference of Tropical Medicine and Malaria. T. Rio de Janeiro, Brazil, Sep 23-27, 2012.
- Nozaki, T. Evolution of the mitochondria under anaerobic conditions: Function and import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle in *Entamoeba histolytica*. Joint International Tropical Medicine Meeting. Bangkok, Thailand, Dec 12-14, 2012.
- 野崎智義 寄生生物ミトコンドリアの特性～嫌気環境下における多様化. J-mit, “Mitochondrial Diversity: shall we find out her multiple faces” (日本ミトコンドリア学会), Tsukuba, Ibaraki, Dec 19-21, 2012.
- Nozaki, T. A novel beta barrel transporter in the mitosome of *Entamoeba histolytica*. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.
- Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., Marumo, K., Sato, E., Takashima, E., Shiba, T., Horton, P., Tsuboi, T., Harada, S., and Nozaki, T. Unique lysosomal targeting system in *Entamoeba histolytica*. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.
- Saito-Nakano, Y., Okadaa, M., Hanadate, Y., Gilchrist, C. A., Crasta, O., Petri, Jr., W. A., Fei, Z., Trapaidze, N., and Nozaki, T. Role of Arf GTPase and traffic to lysosomes in *Entamoeba*

- pathogenesis. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.
- Samie, A., Mahlaule, L., Mbatia, P., and Nozaki, T. Molecular detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* from HIV positive and HIV negative patients in the Limpopo province, South Africa. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.
- Mori, M., Masuda, Y., Kasai, R., Masuma, R., Takahashi, Y., Nozaki, T., Shiomi, K., Omura, S. Inhibitors of *Entamoeba histolytica* cysteine synthase and serine acetyltransferase discovered from secondary metabolites of microorganisms. XVII Seminar on Amebiasis 2013, Merida, Mexico, Mar 1-5, 2013.
- 増田祐衣、森 美穂子、野崎智義、筒井 歩、砂塚敏明、増間碌郎、高橋洋子、大村 智、塩見和朗 微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ原虫特異的含硫アミノ酸代謝酵素阻害物質の探索 日本農芸化学会 2013 年度大会 仙台 March 24-27, 2013.
- 坂元君年 ミトコンドリア呼吸鎖の低酸素適応 日本農芸化学会東北支部第 13 回若手の会 平成 24 年 10 月
- Nagamune, K., Andrabi, S.B.A., and Matsubara, R. Apicomplexan parasites and plant hormones. Protist 2012, July 2012, Oslo
- Nagamune, K., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., Aonuma, H., and Kinoshita, T. The effect of host GPI to *Toxoplasma gondii* infection. Molecular Parasitology Meeting XXIII, Woods Hole, MA, USA, September 2012
- Fkshi, M., Aonuma, H., Matsubara, R., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., and Nagamune, K. The acidic organelle in extracellular *Toxoplasma gondii*. Molecular Parasitology Meeting XXIII, Woods Hole, MA, USA, September 2012
- 永宗喜三郎、福士路花 アピコンプレクサ生物の滑走運動とカルシウム・シグナリング 第 45 回日本原生動物学会大会 2012 年 11 月、兵庫県姫路市
- 松原立真、永宗喜三郎 アピコンプレクサ生物の植物ホルモンとその生理機能 第 45 回日本原生動物学会大会 2012 年 11 月、兵庫県姫路市
- 松原立真、永宗喜三郎 “マラリア原虫が持つ植物ホルモンの網羅的検出と機能解析” 第 1 回日本細胞共生学会若手の会 2012 年 11 月、下田
- 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主細胞膜マイクロドメインがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第 1 回日本細胞共生学会若手の会 2012 年 11 月、下田永宗喜三郎、アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモンの意義 第 1 回マトリョーシカ型生物学研究会、2012 年 7 月、東京
- 福士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 細胞外トキソプラズマにおける未知の酸性オルガネラについて 第 1 回マトリョーシカ型生物学研究会、2012 年 7 月、東京
- 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主アンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第 1 回マトリョーシカ型生物学研究会、2012 年 7 月、東京
- 福士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 細胞外トキソプラズマにおける未知の酸性オルガネラについて 第 20 回分子寄生虫学ワークショップ 2012 年 8 月、神戸
- 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 宿主マイクロドメインがトキソプラズマ感染に及ぼす影響 第 20 回分子寄生虫学ワークショップ 2012 年 8 月、神戸
- 永宗喜三郎 あなたの知らない寄生虫のセカイ～トキソ、マラリア、マトリョーシカ～ 第 63 回バイオ e カフェ 2012 年 9 月、つくば
- 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 宿主細胞膜マイクロドメインがトキソプラズマ感染に与える影響 第 72 回日本寄生虫学会東日本支部会・第 10 回分子寄生虫学・マラリアフォーラム合同大会 2012 年 10 月、前橋
- 川原史也 種鶏におけるコクシジウム症対策 日本チャンキー協会技術ゼミナール、2012 年 4 月
- 川原史也 日本における抗原性の異なる *Eimeria maxim* 野外株の存在 その 1 第 10 回 関東鶏病臨床研究会、2012 年 5 月
- 川原史也 鶏壊死性腸炎実験モデルの構築 茨城県鶏病研究会 技術研修会、2012 年 8 月
- 川原史也 日本における抗原性の異なる *Eimeria maxim* 野外株の存在 その 2 第 11 回 関東鶏病臨床研究会、2012 年 11 月
- 松原立真、川原史也、小嶋美紀子、田原美智留、Andrabi Syed Bilal Ahmad、福士路花、山野安規徳、榊原均、永宗喜三郎 マラリア原虫における植物ホルモンの網羅的検出と機能解析 第 82 回日本寄生虫学会、2013 年 3 月

#### 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

## プロテインノックダウン法を基盤とする創薬研究

国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部  
内藤 幹彦

研究要旨 エストロゲン受容体を標的とした SNIPER(ER)を合成し、SNIPER(ER)が ER を特異的に分解し、乳がん細胞に細胞死を誘導する事を明らかにした。また BCR-ABL 等のタンパク質に結合する新規リガンド探索に必要な実験系構築を行った。

### 研究分担者

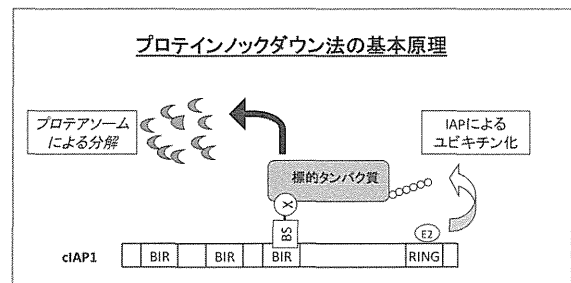
- (1) 国立医薬品食品衛生研究所有機化学部 栗原正明
- (2) 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部 柴田識人
- (3) 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部 服部隆行
- (4) 東京大学医科学研究所 井上純一郎
- (5) 同志社大学生命医科学部 西川喜代孝
- (6) 武田薬品工業(株)化学研究所 長展生

### A. 研究目的

癌治療における選択的キナーゼ阻害剤など、病気の原因となっているタンパク質の機能を阻害する分子標的治療薬の開発が近年盛んに行われている。しかし治療の標的となるタンパク質の中には、病態と関連する酵素活性がないために阻害剤を開発しにくいタンパク質もあり、新しい作用機序をもった画期的医薬品の開発が望まれている。病気の原因となっているタンパク質を選択的に分解する事ができれば、従来にない新しい医薬品を創製できると考えられるが、タンパク質の分解を選択的に制御する技術は国内外ともにほとんど研究が行われていない。

研究代表者らは、独自に分子デザイン・合成した低分子化合物を使って、標的タンパク質を特異的にユビキチン化し、プロテアソームで分解するプロテインノックダウン法を開発してきた (JBC 283, 8961-8 (2008); JACS 132, 5820-6 (2010); FEBS Lett 585, 1147-52 (2011)他)。このプロテインノックダウン法は、ユビキチンリガーゼ cIAP1 に結合する小分子 (BS) と標的タンパク質に結合するリガンド (X) とのハイブリッド化合物 (BS-X) で両タ

ンパク質を架橋し、標的タンパク質を特異的にユビキチン化するという独創的な作用機序に基づいている (図1)。原理的には、リガンド (X) を置換することにより様々なタンパク質の特異的分解に応用できる汎用性の高い技術である。



本研究ではこのプロテインノックダウン技術を基盤とした創薬研究を行う。具体的には、標的タンパク質と結合するリガンドを利用して新しい SNIPER 化合物を開発し、そのプロテインノックダウン活性を *in vitro*、*in vivo* で測定し医薬品候補化合物としての評価を行う。適当なリガンドが見つからない標的タンパク質に対しては、新規結合リガンドのスクリーニングを行い、得られたリガンドを用いて SNIPER 化合物を開発する。

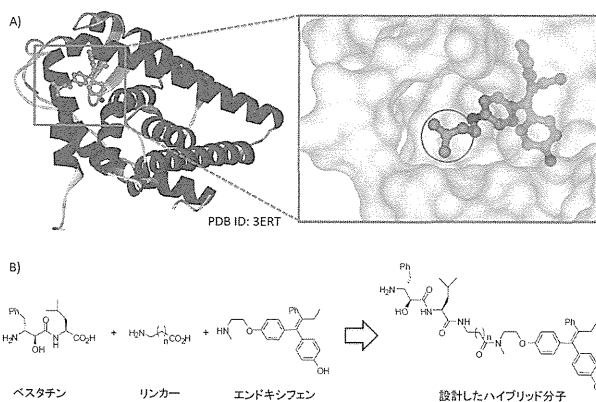
本研究の最終的な目標は、病原性タンパク質を分解する新しい作用機序の新規医薬品を開発する事であるが、今年度はエストロゲン受容体 (ER) を標的とする各種 SNIPER を合成し、その活性を評価する事、及び NF $\kappa$ B シグナル制御因子や BCR-ABL と結合する新規リガンドを探索する事を目的とした。

### B. 研究方法

エストロゲン受容体を標的とする SNIPER(ER)の開発 (栗原、内藤)

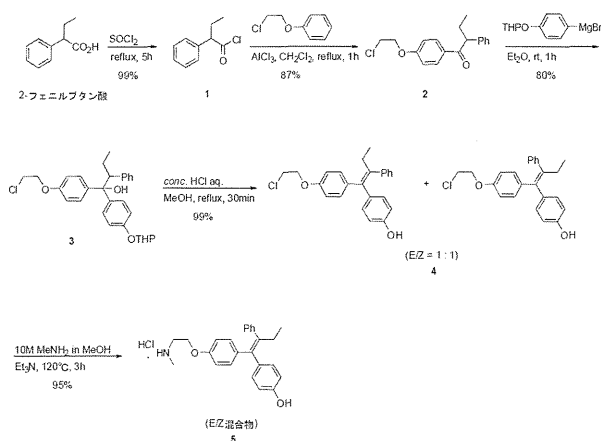
図 2-A には ER と 4-ヒドロキシタモキシフェンの共結晶 X 線解析図 (PDB ID: 3ERT) を示している。

図 2. ER 分解誘導剤の設計



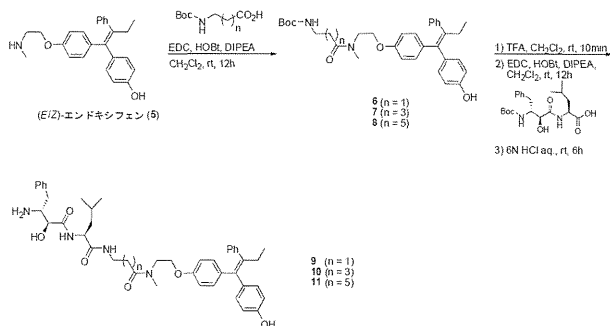
はじめに (*E/Z*) -エンドキシフェン (5) の合成を行った (スキーム 1)。すなわち、2-フェニルブタン酸から誘導した酸クロリド体 1 と 2-クロロエチルエフェニルエテルを Friedel-Crafts アシル化反応により化合物 2 を合成した。次に、化合物 2 に対しアリアルマグネシウムブロミドを反応させ、得られた生成物 3 を濃塩酸で脱水することで化合物 4 を異性体混合物 (*E/Z*=1/1) として得た。最後に、メチルアミノ基を導入することで (*E/Z*) -エンドキシフェン (5) の合成を行った。化合物 5 は異性体混合物のまま次の反応に用いた。

スキーム 1. (*E/Z*) -エンドキシフェン (5) の合成



SNIPER(ER) (化合物 9-11) は、(*E/Z*) -エンドキシフェンに対して N-Boc-アミノアルキルカルボン酸 ( $n = 1, 3, 5$ ) と N-Boc-ペスタチンを順次縮合させ、最後に Boc 基の脱保護を行うことで合成した (スキーム 2)。

スキーム 2. ER 分解誘導剤 9-11 の合成



内藤らは、ヒト乳癌細胞由来 MCF-7 を用いて SNIPER(ER) のプロテインノックダウン活性をウェスタンブロッティングにより評価した。また、ER 分解がユビキチン-プロテアソーム系を介して起きているかどうか確かめるために、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いた系、およびユビキチンリガーゼをノックダウンした系での評価を行った。

### His タグタンパク質を標的とした SNIPER(His) の開発 (栗原、服部)

服部らは、His タグタンパク質を認識するリガンドとして、NTA(Nitrilotriacetic Acid)-Ni<sup>2+</sup>錯体を用いることとした。後述するが、NTA-Ni<sup>2+</sup>錯体は細胞膜透過性を有していないため、栗原らは NTA の COOH 基を細胞内で分解されることが知られている AM (アセトキシメチル) 基で保護して化合物を細胞内に導入し、別途導入した Ni<sup>2+</sup> と細胞内で錯体を形成させることを考えた。また、化合物の細胞膜透過性を検討するために蛍光物質である BODIPY を導入した。以上のことを踏まえて、SNIPER(His) をデザインした。CRABP2 タンパク質に His タグを融合させたタンパク質を発現するシステムを構築し、合成した SNIPER(His) の細胞内への取り込み、His タグ CRABP2 や天然の His タグタンパク質の分解を調べた。

### BCR-ABL に結合するリガンド探索と SNIPER(Abl) の開発 (西川、栗原、柴田)

西川らは、BCR の PH ドメイン (BCR-PHD)

に対する新規ペプチド性リガンドを同定するために、独自に開発した多価型ペプチドライブラリー法を適用した。これは BCR-PHd のリガンド結合部位を標的として、本多価型ペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって、高親和性結合モチーフを同定するものである。スクリーニングにはビーズに固定された状態での BCR-PHd が大量に必要となる。そこで、BCR-PHd 遺伝子の N 末端あるいは C 末端に His-tag に対応する配列を導入し、大腸菌発現ベクターである pET28 にクローニングした。大腸菌での発現量、純度が最適となる条件を検討し、最終的に菌体ライセートから Ni ビーズを用いて高純度の BCR-PHd を大量調製した。また、使用する多価型ペプチドライブラリーは、BCR-PHd のリガンド結合部位との結合能力を指標として最適化を試みた。

### NF $\kappa$ B シグナル制御因子に結合するリガンド探索 (井上、西川)

井上らは、従来の研究から TRAF6 の TRAF-C ドメインが P-X-E-X-X-Ar/Ac (X: 任意のアミノ酸、Ar: 芳香族アミノ酸、Ac: 酸性アミノ酸) 配列を含むペプチドに特異的に結合することが分かっていたことから、TRAF-C ドメインを含む GST 融合タンパク質を調製し、西川らと共同でペプチドライブラリーから TRAF-C ドメインに強く結合する天然に存在しないペプチド配列を同定するためのスクリーニング系を構築した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は、カルタヘナ法を遵守し、各研究分担者が所属する研究機関の遺伝子組換え実験安全管理規則等に則って実施した。

動物実験は、動物愛護法を遵守し、各研究分担者が所属する研究機関の動物実験規則に則って実施するが、今年度は動物実験を実施しなかった。

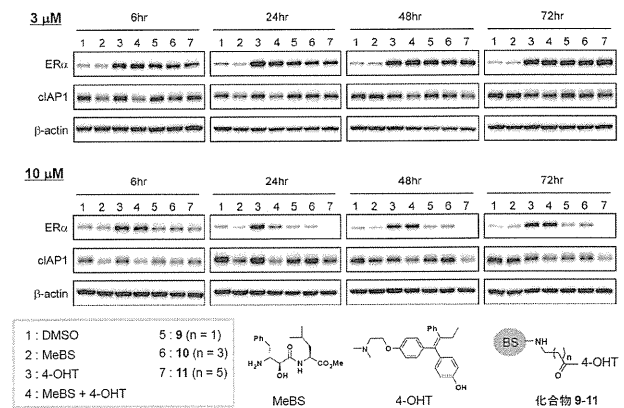
### C. 研究結果

#### エストロゲン受容体を標的とする SNIPER(ER) の開発 (栗原、内藤)

栗原、内藤らは、リンカー長の異なる SNIPER(ER) (化合物 9-11) を合成し、その ER 分解能を評価した (図 3)。通常の培養条件では、血清中に含まれるエストロゲンが ER に結合すると、ER が活性化した後ユビキチン

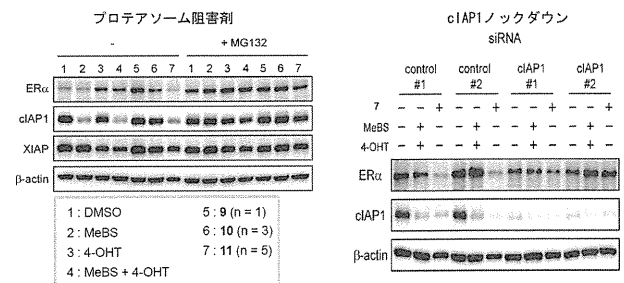
化を受けてプロテアソームで分解されることが知られている。4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) は、エストロゲンと拮抗して ER と結合するため、ER の分解は阻害され、細胞内の ER 量は増加する (レーン 3)。SNIPER で処理した細胞の場合、3  $\mu$ M では 4-OHT 処理

図3. 化合物9-11のER分解能評価 (ヒト乳癌細胞由来MCF-7)



と同様に ER 量が増加し ER の分解は観察されなかったが、10  $\mu$ M では時間の経過とともに ER の分解が誘導されていることが明らかとなった (レーン 5 から 7)。特に炭素数 6 のアルキルリンカーを持つ化合物 11 が最も高い活性を示した。次に、ER の分解がユビキチン-プロテアソーム系を介して起きているかどうか確かめるために、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いた系とユビキチンリガーゼをノックダウンした系での ER 分解評価を行った。その結果、どちらの系においても ER の分解が抑制された (図 4)。

図4. ユビキチン-プロテアソーム系を介したER分解機構の解明



SNIPER(ER)で処理した MCF7 細胞は短時間で細胞死を起こしたが、プロテアソーム阻害剤で ER の分解を阻害すると細胞死も阻害された (図 5)。一方、ER を発現していない U2OS 細胞を SNIPER(ER) で処理しても細胞死は起こらなかった。これらの結果から、SNIPER(ER) は乳がん細胞の ER を分解する事により、乳がん細胞に効率良く細胞死を誘導する事が明ら

かとなった。

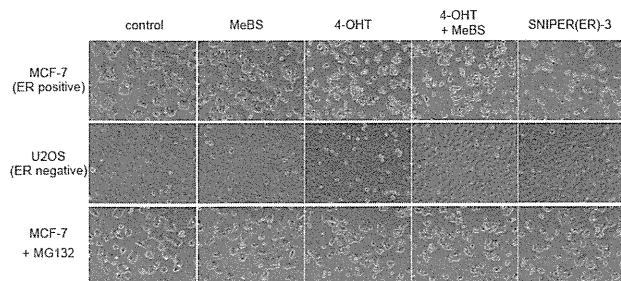


図 5、SNIPER(ER)処理による乳がん細胞の細胞死

### His タグタンパク質を標的とした SNIPER(His)の開発 (栗原、服部)

栗原、服部らは、まず単純に Bs と NTA をつないだ SNIPER(His)-1 を合成し、その活性を評価した。しかしながら、本化合物は細胞内 His タグタンパク質を分解する活性を有していなかった。上記の結果は SNIPER(His)-1 は細胞膜透過性が低く、当該化合物が細胞内に到達していないためであると判断されたため、脂溶性の官能基を導入した SNIPER(His)-2, 3 を新たに合成した。しかし、これらの SNIPER(His) も細胞内に取り込まれず、活性を示さなかった。

これらの SNIPER(His) を使って *in vitro* での結合実験を行った結果、SNIPER(His) は His タグタンパク質と cIAP1 を架橋する活性を示したことから、細胞でプロテインノックダウン活性を示さない原因は細胞膜透過性にあることが推測された。

NTA の 3 つのカルボン酸は水溶性が強く、細胞膜透過性を低下させていることが考えられたので、このカルボン酸を AM 基でマスクした化合物を作製した。AM 基は細胞内に取り込まれた後、細胞内エステラーゼによって加水分解され再び機能的な NTA となる。この化合物を蛍光色素 bodipy (BDP) で標識して細胞内の取り込みを蛍光で観察した。その結果、フリーのカルボン酸の化合物 (BDP-NTA-COOH) は全く細胞に取り込まれないが、AM 基でマスクした化合物 (BDP-NTA-AM) は細胞に効率良く取り込まれることが判明した。

上記結果を受け、BDP-NTA-AM に Bs を付け、SNIPER(His)-4 (Bs-BDP-NTA-AM) を作製し、Ni<sup>2+</sup>存在下に細胞に作用させる試験を行い、His タグタンパク質の分解活性を検証した。予想通り、本化合物は細胞内に取り込まれる活性を有していた。しかしながら、SNIPER

(His)-4 は His タグタンパク質を分解する活性は見られなかった。

### BCR-ABL に結合するリガンド探索と SNIPER(Abl)の開発 (西川、栗原、柴田)

西川らは、BCR-PHd を大腸菌内で発現誘導する条件の最適化を行なった。その結果、C 末端に His-tag を導入したものよりも N 末端に His-tag を導入した方が発現量が顕著に高いことを見出した。そこで N 末端に His-tag を持つ BCR-PHd について誘導時間、温度の最適化を行い、最終的に高純度の BCR-PHd を回収することができた。最適条件下では、150 ml の培養液から 160 μg がビーズに固定化された状態で回収可能であることが示された。多価型ペプチドライブラリーのスクリーニングには 1 回 500 μg 程度の組み換えタンパク質が必要であるが、十分に対応できる純度と収量が達成可能である。

上記のように調製した BCR-PHd の活性を評価するため、可溶化した BCR-PHd を用い、ニトロセルロース上にスポットした各種 lipid との結合活性を検討した。その結果、PC ならびに PI にはほとんど結合が認められないのに対し、PI4P に対してのみ強い結合活性が認められた。このことから、BCR-PHd はリガンド結合に関して十分な特異性と結合能力を保持していることが示された。

### NFκB シグナル制御因子に結合するリガンド探索 (井上、西川)

井上らは、TRAF6 の TRAF-C ドメインを含む TC-a (aa 282-508, Coiled coil 全体を含む), TC-b (aa 333-508, Coiled coil の一部を含む), TC-c (aa 346-504, Coiled coil の一部を含む) を pGEX-6P-1 に挿入したプラスミドを構築した。作成したプラスミドで Rosetta-Gami を形質転換した後、液体培地で 21°C, 8 時間 IPTG で GST 融合タンパク質の発現を誘導した。発現誘導されたタンパク質のおよそ 80% は不溶性であったが、可溶性画分を Glutathione Sepharose カラムにて精製したところ、ビーズ 100 μl あたり TC-a 1.7 μg, TC-b 2.4 μg, TC-c 1.9 μg の精製タンパク質が調製できた。

TNF 受容体ファミリーの受容体 RANK はその細胞質に 3 カ所の TRAF6 結合配列を有し、細胞内で刺激依存的に TRAF6 と結合する。RANK 受容体を動物細胞で過剰発現し、その細胞破砕液をビーズに結合した GST 融合タンパク質



と反応させ、RANK の GST 融合タンパク質への結合を解析した。その結果、TC-b と TC-c には RANK の結合が見られたものの TC-a には結合しなかった。

#### D. 考察

SNIPER(ER) (化合物 9-11) の ER 分解能を評価した結果、 $10\mu\text{M}$  の化合物 9-11 を用いると ER の分解が誘導された。一方で図 3 のレーン 2 からレーン 4 のように、メチルベスタチン、4-ヒドロキシタモキシフェン単体、あるいはその混合物では ER の分解は誘導されていないことから、ベスタチンと 4-ヒドロキシタモキシフェンをつなぐことで初めて ER 分解が誘導されることが明らかとなった。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いた系とユビキチンリガーゼをノックダウンした系では ER 分解が抑制されたことから、ER 分解はユビキチン-プロテアソーム系を介して起きていることが示唆された。すなわち、プロテアソーム阻害剤を入れた系では、ER のポリユビキチン化までは起きていると考えられるが、その後のプロテアソームによる分解が阻害されたことが考えられる。一方で、ユビキチンリガーゼをノックダウンした系では、ベスタチンがユビキチンリガーゼに結合することができずポリユビキチン化が誘導されなかったと考えられる。

本研究でデザインした SNIPER(His) は、His タグ結合部位である NTA を AM 基で保護している。NTA- $\text{Ni}^{2+}$  錯体は細胞膜を透過しないことが知られているため、細胞内で容易に脱保護される AM 基で COOH 基を保護し、化合物を一旦細胞内に導入した後に細胞内で脱保護し、別途導入した  $\text{Ni}^{2+}$  と細胞内で錯体を形成させることを考えた。各ステップは高収率で化合物を得ることができたが、BODIPY は強酸や強アルカリに不安定であり、一般的な  $\text{NH}_2$  基の保護基である Boc 基を使用することが出来ないため、合成ルートを最適化する必要があった。スキーム 3 は最適化後の合成ルートである。最終的に総収率 7.2% で SNIPER を得ることができた。しかしながらこのようにして合成した SNIPER(His) は、これまでのところ有効なプロテインノックダウン活性を示すことができなかった。 $\text{Ni}^{2+}$  を同時に加えたとは言え、細胞内には  $\text{Ca}^{2+}$  等多くの二価金属イオンが存在する。これら金属イオンが阻害的に働き、細胞内で機能的な Ni-NTA の形成がなされていない可能性が考えられる。

BCR-ABL に結合するリガンド探索では、今後 BCR-PHd のリガンド結合部位特異的な結合モチーフを取得するにあたり、標的となる部位に変異を導入した BCR-PHd 変異体が必要となる。すなわち、野生型 BCR-PHd に強く結合するが BCR-PHd リガンド結合部位変異体には結合しないことを指標にスクリーニングを行なう。このためリガンド結合部位に存在している複数のアミノ酸に関して、一連の部位変異体を作成予定である。調製でき次第、多価型ペプチドライブラリースクリーニングによるモチーフ取得を試みる。SNIPER 開発にとって問題となるのは得られた化合物の膜透過性である。この点、ペプチドライブラリー法は、取得されたペプチドモチーフの各ポジションのアミノ酸の重要性を定量的に評価できるという優れた特徴を有している。このため、膜透過性付与をはじめ、protease 耐性、安定性向上など、さまざまな機能修飾が可能である。最終的には、得られたモチーフをベースとして十分な膜透過性、安定性を有する SNIPER へと発展させてゆく予定である。

NF $\kappa$ B シグナル制御因子に結合するリガンド探索においては、TC-a が RANK 結合能を持たない理由は不明であるが、TC-b と TC-c については結合能を確認でき今後は次の段階に進めることが可能である。ペプチドライブラリーを用いたスクリーニングにはビーズ  $100\mu\text{l}$  あたり  $1\text{mg}$  の融合タンパク質を結合させることが要求されており現在その濃縮方法を検討している。一番収率が良かった TC-b でさえ約 400 倍濃縮する必要がある。予備実験で GST 融合タンパク質を一度ビーズから遊離させ再び少量のビーズに吸着させることによりこの程度の濃縮が可能であることがわかりスクリーニングの準備はほぼ完了した。また、別のグループから、TC-b は多量体形成が可能である事が報告されており、このことはペプチドライブラリーのスクリーニングに有利であることから、今後は TC-b を必要量調製しスクリーニングに移行する予定である。

#### E. 結論

今年度の研究では、ユビキチンリガーゼに結合するベスタチンと ER リガンドである 4-ヒドロキシタモキシフェンをアルキル鎖でつないだ SNIPER(ER) が、ヒト乳癌細胞 MCF-7 のエストロゲン受容体を分解し、乳がん細胞に効率良く細胞死を誘導する事を明らかにした。分解機構を解析した結果、SNIPER(ER) は

ユビキチン-プロテアソーム系を介したエストロゲン受容体の分解を誘導する事が明らかとなった。SNIPER(ER)は、乳がん細胞におけるERの発現そのものを減少させ、がん細胞を自滅に導くことができるため、乳がんに対する新たな治療薬開発につながる事が期待される。

他のタンパク質を標的とした SNIPER の開発についても、新規結合リガンド探索などで成果を挙げることができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Itoh Y, Ishikawa M, Kitaguchi R, Okuhira K, Naito M, Hashimoto Y. Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* (2012) 22: 4453-7

Demizu Y, Okuhira K, Motoi H, Ohno A, Shoda T, Fukuhara K, Okuda H, Naito M, Kurihara M. Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy. *Bioorg Med Chem Lett* (2012) 22: 1793-6.

### 2. 学会発表

正田卓司, 加藤雅士, 井上英史, 服部隆行, 内藤幹彦, 栗原正明, 細胞膜透過性蛍光 NTA の創製, 第 56 回日本薬学会関東支部会

加藤雅士, 正田卓司, 井上英史, 服部隆行, 内藤幹彦, 栗原正明, 細胞膜透過性蛍光 NTA の設計・合成, 日本薬学会第 133 年会

Okuhira, K., Demizu, Y., Ohoka, N., Shibata, N., Hattori, T., Nishimaki-Mogami, T., Kurihara, M., Okuda, H., Naito, M. Development of SNIPER(ER) that induces estrogen receptor degradation followed by rapid cell death in breast cancer cells. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research (2013.2)

## G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

## 先天性中枢神経脱髄病の治療薬開発に向けた研究

独立行政法人国立成育医療研究センター  
研究所 薬剤治療研究部  
山内 淳司

**研究要旨** 本研究では、治療薬がない先天性中枢神経脱髄病の創薬標的候補分子の探索研究を行うことを目標としている。そのために、創薬標的分子の探索研究をインビトロレベルから動物実験レベルで検討する研究を行い、いくつかの標的をとらえることに成功した。

### 研究分担者

- (1) 独立行政法人国立成育医療研究センター  
宮本 幸
- (2) 首都大学東京  
久永眞市
- (3) 株式会社免疫生物学研究所  
前田雅弘
- (4) 田辺三菱製薬株式会社  
加藤 稔

### A. 研究目的

神経変性症のなかでも、アルツハイマー病やパーキンソン病のように神経細胞そのものが変性する病気はよく知られている。一方、神経細胞の機能を高めたり、保護したりする役割をもつグリア細胞が神経細胞よりも先に変性する神経変性症もある。この型の神経変性症の特徴は、グリア細胞の機能不全が神経細胞の機能不全を引き起こし、最終的に神経変性や細胞死を誘導することである。

先天性中枢神経脱髄 Pelizaeus-Merzbacher 病 (PMD) は先天性のグリア細胞の変性症である。現在知られる唯一の先天性の脳および脊髄 (中枢神経) のミエリン (髄鞘) 形成細胞の変性疾患である。中枢神経の髄鞘形成細胞は希突起膠細胞 (オリゴデンドロサイト) とよばれ、それは PMD 以外にも多くの病変の対象になっている細胞である。さて、PMD の疫学調査は、欧米諸国で既に何度か行われており、20 万人から 30 万人にひとりの割合で病因を有することが明らかにされている。国内でも疫学調査が行われ、およそ 100 家族いることが知られている。

PMD の原因遺伝子の蛋白質産物は四回膜貫通型構造を有すると推定される PLP1 である。PMD は、この PLP1 をコードする遺伝子が重複、欠損、変異することでおこる病気である。しかし、この主要な原因遺伝子が数十年前に同定されたにもかかわらず、今日に至っても、特異的治療薬や治療

方法が開発されていない。その理由はいくつかあるが、最大の理由は治療薬の標的分子が明らかにされていないことである。

また、それは髄鞘組織の構造にもある。病変組織である髄鞘はオリゴデンドロサイトが神経細胞の軸索の周りを幾重にも巻くという複雑な構造をとっている。したがって、もし再生医療技術を応用するとしても、現時点では、そのような複雑な組織構造を再生することは難しいと考えられる。

さて、先述したように PMD は遺伝性の疾病であるため、治療薬ができて、それを根本的に治療することは難しいかもしれない。しかし、病態時に強く活性化または不活性化される分子または分子経路を阻害または活性化したり、病変細胞を保護するような分子経路を活性化することで病態が改善できると考えられる。これらの治療方法は、家族性のパーキンソン病などで提案されている欧米の治療戦略と同じである。例えば、パーキンソン病の場合は、変異パーキン蛋白質が原因で細胞内ストレスシグナルが誘導されるが、このストレスシグナルは病態時特有のもので、それを抑制することで病態改善がみられることが明らかにされている。変異 PLP1 が原因でおこる PMD においても、同様の現象が知られており、その経路を抑制することで、すくなくともインビトロレベルで PMD の髄鞘変性が改善されることが報告されている。

本研究では、このような戦略のもと、PMD 治療薬開発を目的とし、その標的分子を明らかにすることを試みている。独自のインビトロ髄鞘変性システム (共培養系) を利用して、さまざまなライブラリーを用いて PMD 治療薬の標的候補分子を明らかにし、そこで明らかにされた候補分子を動物実験レベルで検証する研究を行っている。その過

程でいくつかの標的をとらえることに成功している。また、これらの研究の技術開発を促進し、国内外でのPMDの創薬研究を促進させることも研究目的のひとつである。

## B. 研究方法

以下、順番に、治療薬の標的候補分子をインビトロで探索する研究から、それを動物実験レベルで検証する方法を記載する。

【インビトロでの髄鞘形成を再現するための必要な神経細胞の単離】

まず、神経細胞の単離に関して述べる。神経細胞は、胎生中期のラットやマウスの神経節から実体顕微鏡を用いて単離する。神経節を用いる理由は他の神経細胞に比べて、10倍以上の神経軸索を伸ばすことができるため、後述の共培養が長時間安定するためである。さて、神経節単離後、それを0.25%トリプシン(シグマ社が良い)で処理し、細胞を分散させる。その後、I型コラーゲン基質でコートされた25mmカバーガラス上に神経細胞をまき、2から3日おきに100ng/ml NGFとN2サプリメントおよび5%ウシ胎児血清を含むDMEM培養液を交換する。このとき、交互に、フルオロウリジンを含む培養液を使用する。これによって、神経細胞以外の線維芽細胞などが除去される。

これらの条件下で2から3週間培養すると、高純度の神経細胞が得られる。この条件で神経軸索を10mm以上伸ばす細胞もある。

【インビトロでの髄鞘形成を再現するための必要なオリゴデンドロサイトの単離】

次に、グリア細胞の単離に関して述べる。オリゴデンドロサイトの単離はきわめて難しいが、研究分担者と研究代表者によって、安定した単離、培養法の確立に成功した。以下、ラット大脳からオリゴデンドロサイトの精製方法を順に述べる。

① 胎生15日のラット大脳(小脳や視床領域を採取しないように注意する)数個を摘出し、0.25%トリプシンで組織を分解する。このとき、数分毎に組織が分解されているか注意深く観察する。

② 組織が完全に分解されてきたら、10%血清の入ったMEM培養液を入れ分解反応を止め、遠心し、沈殿した細胞をポリリジン(PLL)(シグマ社が良い)でコートとした細胞培養皿にまく。

③ 1週間後、0.05%トリプシン(シグマ社が良い)で細胞をはがし、再びPLLでコートとした細胞培養皿にまく。

④ さらに1週間後、0.05%トリプシンで細胞をはがし、細菌培養皿にまく。この過程で、オリゴデンドロサイト前駆細胞が95%まで精製される。

⑤ 2日後、10ng/ml PDGF及び10ng/ml bFGFの入ったRaff培地に換え、2日間培養する。この過

程で、オリゴデンドロサイト前駆細胞が劇的に増殖する。

⑥ 2日後、10ng/ml PDGFを抜き、10ng/ml bFGFと30ng/ml T3および40ng/ml T4ホルモンを添加したRaff培地に換え、オリゴデンドロサイトへの分化誘導をかける。実験状況に応じ、1日から7日間培養する。

以上の方法で、高純度のオリゴデンドロサイト前駆細胞およびオリゴデンドロサイトを得ることができる。

【髄鞘変性を再現するインビトロの共培養システム】

神経軸索を伸ばした神経節神経細胞上に、およそ $3 \times 10^6$ 個のオリゴデンドロサイト(正確に述べると、オリゴデンドロサイト前駆細胞)をまく。さて、上述の分化培地で、およそ5から7日間、2細胞間の接触培養を行うと、オリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索に沿って増殖する。その後、数週間すると、オリゴデンドロサイト前駆細胞が髄鞘形態をもつオリゴデンドロサイトに分化し、インビトロで髄鞘組織が形成される。この場合、NGF中和抗体やNGF中和蛋白質を用いて、髄鞘形成を積極的に誘導することもある。インビトロでの髄鞘形成は実際に生体内でできる髄鞘形成のタイムコースとほぼ等しく、それぞれの時期の遺伝子変動(トランスクリプトームのプロファイリング)はほぼ生体内と同じであることを確認している。

オリゴデンドロサイト前駆細胞が神経軸索上で増殖するときに、PLP1をコードするレトロウイルスを感染させる(後述を参照)と、髄鞘形成不全がインビトロで再現される。ただし、感染したオリゴデンドロサイトは病的な状態ではあるが、その細胞死は観察されない。この実験系は、研究代表者および研究分担者らが2008年にヒューマンサイエンス振興財団の審査を経て、同財団を通して特許出願(特願2008-208155)した培養系に若干の変更を加えたシステムである。

【ShRNAライブラリーを用いた治療薬の標的分子のスクリーニング】

PLP1発現により誘導された不完全髄鞘を改善または抑制する標的分子を明らかにするために、研究代表者および研究分担者らによって作成された線状型RNA(shRNA)ライブラリーを、レトロウイルス(タカラクロンテック社)にパッケージングしたものを、ウイルス力価/MOI値(タカラクロンテック社キットで測定)0.3から1の範囲内で、PLP1と同時に、オリゴデンドロサイトに共感染させた。このスクリーニングの過程で、おのおのウイルスに含まれるshRNAが細胞に感染す