

論文の内容の要旨

論文題目 *In vitro/in vivo* effects of ascofuranone on African trypanosomes

和訳 アフリカトリパノソーマ原虫に対するアスコフラノンのインビトロ及びインビボ効果に関する研究

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 中村 公亮

序

アフリカトリパノソーマ原虫による感染症は、ヒトではアフリカ睡眠病を発症し、一度感染すると死にいたる可能性が非常に高いことが知られており、現在においても多くの人々の健康と福祉に多大な被害を与えている。WHO では、毎年約 5~7 万人の感染者を確認しているが、実際には報告値よりもはるかに多くの患者が治療を受けることなく死亡していると考えられ、約 7 千万人が新たな感染の危険にさらされている。一方、この原虫は、家畜においては、ナガナ病と呼ばれる寄生虫症を引き起こすため、アフリカにおいて多くの貴重な動物性タンパク資源の損失を招いている。このような状況を背景として近年、WHO は、この寄生虫症を人類が早急に制圧すべき感染症の一つに掲げた。しかし、アフリカトリパノソーマ原虫は表面抗原の変異によって宿主血流中内において免疫システムを巧妙に回避し、ワクチンの開発など有効な対策を講じるに至っていない。そこで化学療法が唯一の治療手段となっているのが現状であるが、現在使用されている抗トリパノソーマ薬は、それらの大半が開発後 60 年以上経過したことによる多剤耐性株の出現、強い副作用、効果の原虫種特異性などが

問題点となっている。このようなことから、特にヒトを治療の対象にした場合、副作用の少ない安全で、かつトリパノソーマ原虫の種を問わない即効性のある新規薬剤の開発が急務となっている。

宿主血流中に寄生したトリパノソーマ原虫のエネルギー代謝は、主に解糖系に依存しており、解糖系酵素を高濃度を含むグリコスームと呼ばれるオルガネラ内で営まれている。ミトコンドリアは、ATP 合成に直接的には関与しないが、その呼吸系における特殊な役割は原虫の増殖に不可欠であると考えられている。すなわち、グリコスーム内における解糖を常に進行させるためには NADH の再酸化が必要であり、これにミトコンドリアの呼吸鎖が深くかかわっている。その呼吸鎖の末端酸化酵素として働くのがミトコンドリアに局在するシアン耐性末端酸化酵素(Trypanosome Alternative Oxidase; TAO)である。この酵素は宿主(哺乳類)には存在しないことから、アフリカ睡眠病制圧のための格好の薬剤標的となり得る。私の所属する研究室ではこの酵素を標的とした薬剤開発に関する研究が行われてきた。その結果、糸状菌の産生するアスコフラノンが TAO をきわめて低濃度で阻害することを見い出すに至った。本研究では、以上のような経緯を踏まえ、原虫細胞を用いてアスコフラノンの抗トリパノソーマ効果に関する基礎的な実験を行うとともに、標的とするアフリカトリパノソーマ原虫 TAO の酵素としての解析を試みた。さらには、アスコフラノンを実際の抗トリパノソーマ薬として利用することを最終目標と考え、アスコフラノンの作用を増強するグリセロールとの併用効果とその作用機序について調べた。

1. ヒト感染性トリパノソーマ原虫の TAO アミノ酸配列決定

これまで TAO の研究には非ヒト感染性トリパノソーマ原虫株 *Trypanosoma brucei brucei* が用いられてきた。しかし、ヒトを治療の対象にした場合、ヒト感染性トリパノソーマ原虫株由来の TAO を用いた種々の解析が必須である。そこで、私は、帯広畜産大学原虫病研究センター助教授・井上昇博士から分与されたヒト感染性トリパノソーマ原虫 *T. b. rhodesiense* 及び *T. b. gambiense* から TAO のクローニングを試みた。これらの TAO の cDNA 配列の解析を行った結果、非ヒト感染性原虫 *T. b. brucei* 由来の TAO とヒト感染性 *T. b. rhodesiense* 及び *T. b. gambiense* 由来の TAO とは、それぞれのアミノ酸配列において、完全に一致していた。このことは、TAO を標的とすることにより、トリパノソーマ原虫の種を問わないドラッグデザインが可能になることを示している。またこれまで *T. b. brucei* の酵素を用いて蓄積されてきた実験結果がそのまま有力な情報として利用できることを示しており、この知見は以降の研究を進める上で極めて貴重な意味を持っている。

2. 部位指定変異法による組み換え TAO の解析

TAO はミトコンドリア内膜に存在する膜タンパク質であり、合成量が低いという制約がある上、酵素自体が非常に不安定であり生化学的解析は遅れている。そこで、TAO を含む *alternative oxidase* 酵素ファミリーのアミノ酸配列において、保存性が高く、反応中心金属の鉄に配位すると考えられる *di-iron* 結合モチーフとその周辺のアミノ酸配列の重要性を調べるために、大腸菌を用いた組み換え TAO の部位指定変異解析を行った。酵素の評価システムとしては次の 3 つの方法を用いた。すなわち、(1) 変異酵素で形質転換した大腸菌へム生合成系酵素欠損 ($\Delta hemA$) 株呼吸鎖の末端酸化酵素が TAO のみであることを利用して大腸菌の成長曲線で活性を評価する方法、(2) TAO に対する薬剤阻害活性への変化をその大腸菌の増殖から簡便にスクリーニングする方法、及び (3) 酵素学的に TAO のユビキノール酸化反応を測定する方法を用いた。現在データベースに登録されている約 70 種の *alternative oxidase* 酵素のアミノ酸アライメントに基づいて、それらに共通して高度に保存されている領域内のアミノ酸残基をそれぞれアラニン残基に置換し、個々の残基の重要性についての解析を進めた。その結果、TAO にはこれまで活性に必須と考えられてきた *di-iron* 結合モチーフの他に、グルタミン酸残基とチロシン残基が 6 個のアミノ酸残基をはさんだ領域が、TAO の活性発現に重要な役割を果たしていることを明らかにすることができた。この新しい E(X)₆Y モチーフは、*alternative oxidase* 酵素に共通して見られるだけでなく、*di-iron* タンパク質として機能する Δ^9 -desaturase や *ribonucleotide reductase* R2 subunit (RNR) 等に共通して存在しており、この E(X)₆Y モチーフの普遍性と機能的な重要性を示している。

得られた変異酵素については、さらにアスコフラノンに対する感受性の変化について調べた。その結果、野生型酵素 (IC₅₀ 値 0.20 nM) に比べアスコフラノンに対して耐性を示す、E(X)₆Y モチーフ近傍での部位指定変異、特に E216A (IC₅₀ 値 0.60 nM) と Y247A (IC₅₀ 値 0.55 nM) の変異が明らかになった。このことは、TAO のこれらのアミノ酸がアスコフラノンとの相互作用に関わっていることを示唆している。

3. 原虫を用いた薬剤アッセイとグリセロール効果の標的解析

最後に、アスコフラノンの生体内での薬理効果を調べるために、マウスを用いた感染治療についての検討を行った。また *in vivo* での効果を詳細に調べるために、ヒト感染性アフリカトリパノソーマ原虫株の血流型培養系を確立し、実際に、この系を用いて、アスコフラノンの抗原虫増殖抑制効果を明らかにした。すなわち、アスコフラノンは単独で極めて低濃度 (MIC 値: 3.36 nM, *T. b. rhodesiense*; 2.45 μ M, *T. b. gambiense*) で死滅させることができ、アスコフラノンがこれまで研究されて

きた *T. b. brucei* のみならずヒト感染性の原虫に対し有望な抗トリパノソーマ剤であることが確認された。

体内における薬剤の代謝などを考えた場合、効果の即効性を追及しなければならぬ。アフリカトリパノソーマ原虫は TAO を阻害することによる好氣的エネルギー代謝の遮断が起きた場合、嫌氣的エネルギー代謝を働かせると考えられてきた。嫌氣的エネルギー代謝時に作用するグリセロールキナーゼ(GK)は、解糖系産物である glycerol-3-phosphate と ADP を基質としてグリセロールと ATP を合成する。しかし、グリセロールを過剰に投与するとその GK 活性の逆反応が起こり、最終的に嫌氣的呼吸鎖の遮断が起こるとされていたが明確な証拠はなかった。そこで、まず、ヒト感染性原虫に対するグリセロールとの併用効果について調べたところ、グリセロールを添加することでアスコフラノン単独の場合に比べ、約 1/1000 の低濃度で即効性を示すことが判った。グリセロールは、現在、実際にヒトの脳梗塞患者の治療時など臨床現場で使用されており、その安全性は実証されていることから AF の実用化にとっては貴重な知見が得られたと考えられる。さらに原虫体内において、グリセロールの GK に及ぼす影響を明らかにするため、GK 遺伝子をノックダウンする目的で、二本鎖 RNA 干渉(dsRNAi)を可能とするトリパノソーマ原虫の組換え体を作成し、アスコフラノンとグリセロールとの併用効果を *in vitro* で調べた。その結果、予測に反して、GK ノックダウン株にアスコフラノン感受性の上昇はみられなかった。この事実は、これまで考えられたきた様な GK の嫌氣的エネルギー代謝への中心的な役割を再考すべきということを示している。また GK ノックダウン株でもグリセロール併用効果が観察され、グリセロールの標的が GK 以外であることが明確になった。

結語

アフリカトリパノソーマ症は家畜の被害も含め多数のアフリカの人々を苦しめ、しかも特効薬が存在しない。本研究では、アスコフラノンが特にヒト患者への新規抗トリパノソーマ薬として極めて有望な薬剤であることを示すことができた。さらにアスコフラノンの抗トリパノソーマ効果にグリセロールが即効性と効果増強に有効であることを明らかにすることができた。すでにケニアにおいて中型動物を用いた感染治療実験も開始しているが、本研究が新しい抗トリパノソーマ剤として、一刻も早くアスコフラノンのヒトへの臨床応用へ近づくための有益な情報を提供したと確信している。