

## 審査の結果の要旨

氏名 中村公亮

本研究で得られた成果は、アフリカトリパノソーマ原虫のエネルギー代謝系を標的として新規な抗トリパノソーマ症薬を開発しようとする研究潮流に大きな前進をもたらす内容を含んでおり、高く評価される。本研究では、アフリカトリパノソーマ原虫の呼吸鎖構成成分の一つであるユビキノール酸化酵素 (TAO) が宿主となる哺乳類には存在しないことに着目し、TAO 阻害剤を抗トリパノソーマ症薬として利用することの可能性が追求されている。すなわち、本研究では、酵素タンパク質としての TAO の解析をもとに、TAO の特異的阻害剤であるアスコフラノン (AF) の抗トリパノソーマ効果を *in vitro* 系だけでなく実際に原虫を用いて *in vivo* 系で調べている。さらに、その際にはグリセロールと併用すれば AF の効果が即効作用と同時に増強されることを明らかにし、その作用機序についても考察している。本研究成果の概要は次のとおりである。

1. これまで TAO の研究には非ヒト感染性アフリカトリパノソーマ原虫株 *T. b. 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、ヒト感染性の原虫株 (*T. b. rhodesiense* と *T. b. gambiense*) を用いた解析が要求される。本研究では、*T. b. rhodesiense* 及び *T. b. gambiense* から TAO のクローニングが試みられ、TAO の cDNA 配列の解析が行われた。その結果、非ヒト感染性 *T. b. brucei* 由来の TAO とヒト感染性 *T. b. rhodesiense* 及び *T. b. gambiense* 由来のそれとの間には、アミノ酸配列の完全一致が示された。このことは、TAO を標的にすれば、原虫の種を問わずに抗トリパノソーマ症薬をドラッグデザインすることができる可能性を示唆している。また、このことは、これまで *T. b. brucei* の TAO を用いて蓄積されてきた研究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いる。

2. TAO を含む alternative oxidase 酵素ファミリーのアミノ酸配列の相同性解析を行ったところ、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 結合モチーフの存在が明らかにされた。そこで、部位指定変異解析によって di-iron 結合モチーフ近傍のアミノ酸配列の重要性が調べられた。すなわち、大腸菌へム欠損株が作成され、シアン耐性で末端酸化酵素として働く TAO を組換え酵素として発現させることでその大腸菌の増殖をレスキューする実験系が組み立てられた。di-iron 結合モチーフ近傍の主要アミノ酸を全てアラニンに指定変異する alanine-scanning によって、TAO 活性活性に必須なモチーフ (-E(X)<sub>6</sub>Y-) の存在が明らかにされた。

3. AF の *in vivo* での抗トリパノソーマ効果を調べるために、マウスを用いた感染治療実験が行われた。本研究では、ヒト感染性トリパノソーマ原虫株の血流型培養系が確立されている。この系を用いて、AF にヒト感染性原虫の増殖を抑制する効果があることが示された。すなわち、AF は *T. b. rhodesiense* に対して MIC 値 3.36 nM、*T. b. gambiense* に対しては MIC 値 2.45  $\mu$ M の極めて低濃度で致死的効果を示すことが明らかにされた。この研究によって、AF 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ても有望な薬剤である事が示された。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いる。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 を合成し嫌氣的代謝の主要な役割を担うと推測され、グリセロールを過剰に投与するとその GK 活性の逆の反応が起こり、最終的に嫌氣的呼吸鎖の遮断が起こることが予測されてきた。そこで本研究では、実際にヒト感染性原虫を用いてグリセロールとの併用効果を調べたところ、グリセロールを添加することで AF 単独の場合に比べ、約 1000 倍の感度で即効性を示すようになることが示された。グリセロールの併用効果の作用機序を明らかにするために、GK をノックダウンした原虫が創出され、原虫体内におけるグリセロールの GK に及ぼす影響が詳細に調べられた。

以上のように、本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* 系を用いて、アフリカトリパノソーマ原虫由来の TAO に関する基礎的な知見が明らかにされ、その後、TAO の阻害剤である AF の治療薬としての有効性が調べられた。特記すべきは、AF の抗トリパノソーマ作用に対するグリセロールの併用効果である。本研究は、新しい知の創出、価値ある知の発見をもたらしており、博士の学位の授与に値するものであると判断される。