

論文の内容の要旨

論文題目 クリプトスポリジウムのシアン耐性酸化酵素 (AOX)
及びマイトソーム呼吸鎖の生化学的解析

指導教員 北 潔教授

東京大学大学院医学系研究科

平成19年4月進学

博士後期課程 国際保健学専攻

氏名 原田 倫世

クリプトスポリジウム症は水様性下痢を主徴とする。後天性免疫不全症候群 (AIDS、エイズ) 感染の拡大とともに重要性が再認識され、1976年には世界保健機関により新興・再興感染症に指定された日和見感染症である。エイズ患者などの免疫不全者や老人にはしばしば致命的となるが、健常人にとっても自然治癒するまでの10日~2週間は激しい下痢に襲われる。飲料水やプール利用に起因する水系感染が世界各地で報告されている。また、人畜共通感染症であるため家畜、特に子ウシに対する経済的被害も深刻であるが、現在効果的な薬剤がない。

クリプトスポリジウム症の病原体はクリプトスポリジウムである。クリプトスポリジウム属の研究モデルとして *Cryptosporidium parvum* が用いられており、腸管微絨毛の上皮細胞に寄生し、同一宿主内で無性生殖と有性生殖を繰り返しながら増殖する。TCA回路及び呼吸鎖複合体をコードする遺伝子がゲノム上に見出されず、解糖系によりATP産生を行うと考えられている。ATP産生を行わず、ゲノムを持たない二重膜オルガネラをマイトソームと呼ぶ。マイトソームはミトコンドリアが縮退したものであり、いくつかの嫌気性微生物に存在するが、クリプトスポリジウムにはマイトソームが存在する。

植物、菌類、緑藻類、原生動物にみられるシアン耐性酸化酵素 (Alternative oxidase, AOX) はミトコンドリア呼吸鎖シトクロム *c* 酸化酵素に対する代替末端酸化酵素であり、ミトコンドリア内膜内外のプロトン濃度勾配の形成に関与しない。クリプトスポリジウムは AOX 遺伝子をゲノム上にコードし、その組換えタンパク質がシアン耐性ユビキノール酸化酵素活性を持ち、アスコフラノン (ascofuranone, AF) により極めて低濃度 ($IC_{50}=0.3$ nM) で阻害することが私の所属するグループにより報告されてきた。さらに予備的な実験により AF は *C. parvum* の増殖抑制及び感染免疫不全マウスに対する治癒効果を示すことから、AF はクリプトスポリジウム症に対する新規薬剤として期待され、AOX は原虫の増殖に必須であると考えられる。

本研究では免疫不全マウスへの感染の条件・細胞破碎法・細胞分画法を検討することによりマイトソーム調製法を確立し、AOX の生化学的解析を行った。また薬剤開発を見据え、AF 誘導体の構造活性相関解析を行うことによって、AOX の阻害に必要な AF の構造を検討した。

1. 生化学的解析のための *C. parvum* 実験系の確立

C. parvum は HNJ-1 株を用い、免疫不全状態にある Sever combined immunodeficiency マウス (SCID マウス) により継代した。感染接合子嚢であるオーシストはマウス糞便を回収し、ショ糖浮遊法及び塩化セシウム密度勾配遠心法により精製した。生化学的解析のために十分な研究試料を得るために、SCID マウスへのオーシストの感染時期や接種量の最適化を行ったところ、5 週齢のマウスに 1×10^5 オーシストを感染させた場合にマウス 20 匹の糞便から従来の 2 倍に相当する約 2×10^9 個の原虫を得ることが可能となった。マウス一匹あたりのオーシストの回収量が増えたことは SCID マウスが高価なことに加えて、動物への愛護の観点からも有用である。

続いて *C. parvum* の細胞破碎法として、以下の5つの方法、すなわち 1) 超音波破碎、2) ビーズビーターによるビーズ破碎、3) シリコンカーバイドの粉末によるホモジナイズ、4) ダウンス型ガラスホモジナイザーを用いた破碎、5) ガラスビーズを含む 1.7 ml プラスチックチューブ内でのペッスルによるホモジナイズによる方法を検討した。細胞破碎後に $900 \times g$, 10 分、 $5,000 \times g$, 10 分、 $12,000 \times g$, 20 分、 $200,000 \times g$, 20 分の遠心操作 (4°C) によりオルガネラを大きさと密度により分画した。光学顕微鏡観察により、 $900 \times g$ 沈殿画分のみ未破碎の原虫が含まれていたことから $900 \times g$ 沈殿画分を未破壊画分とした。その他の画分については *C. parvum* マイトソームに局在する Hsp70 を指標としてウエスタンブロット解析により評価した。ミトコンドリア型 Hsp70 は可溶性タンパク質であるが、マイトソームに局在するため遠心後は沈殿画分に観察されると考えられる。1)~4) の方法で破碎したときには Hsp70 は $200,000 \times g$ 上清画分に多く観察され、5)の方法の時のみ、Hsp70 は $5,000 \times g$ 沈殿画分に多く観察された (図 1)。よって、 $5,000 \times g$ 沈殿画分を粗マイトソーム画分とし、以上の方法により *C. parvum* 粗マイトソームの調製法を確立した。

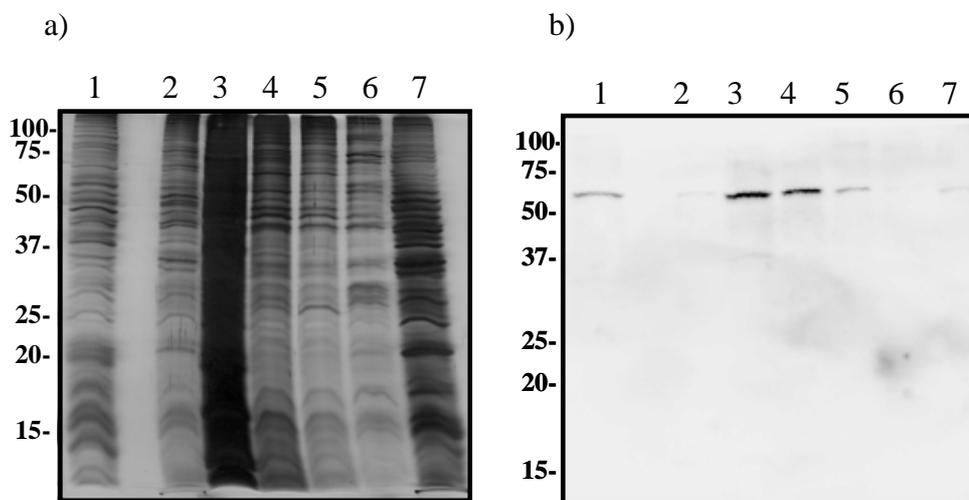


図 1 細胞分画後の各画分に含まれるタンパク質と Hsp70 の局在

C. parvum スポロゾイトをガラスビーズ及びペッスルを用いて穏やかに破碎した時の細胞分画後の画分を用いた。a) SDS-PAGE 後の銀染色、b) 抗 *C. parvum* Hsp70 血清を用いたウエスタンブロット。レーン 1: 1×10^6 オーシスト、レーン 2: 1×10^6 ライセート、レーン 3: $900 \times g$ 沈殿画分、レーン 4: $5,000 \times g$ 沈殿画分、レーン 5: $12,000 \times g$ 沈殿画分、レーン 6: $200,000 \times g$ 沈殿画分、レーン 7: $200,000 \times g$ 上清画分。 $200,000 \times g$ 上清画分はアセトン沈殿で濃縮した。レーン 3~7 は 1×10^7 のオーシストに相当する試料を泳動した。オーシスト、 $900 \times g$ 沈殿画分、 $5,000 \times g$ 沈殿画分に抗 Hsp70 抗体と交差反応する 70 kDa のタンパク質が観

察された。

2. *C. parvum* 粗ミトソーム画分を用いた AOX の解析

C. parvum AOX の翻訳産物の発現と局在、活性に注目して解析を行った。組換え酵素の未変性及び変性ペプチドを抗原として *C. parvum* AOX 特異的な抗 A 抗体, 抗 B 抗体を作製したところ、抗 A 抗体により 28 kDa、抗 B 抗体により 39 kDa・46 kDa・65 kDa のタンパク質を再現よく検出した。さらに局在解析を目的として細胞分画後の標品によるウェスタンブロット解析を行った結果、28 kDa 及び 65 kDa のタンパク質は 5,000 × g 沈殿画分に、39 kDa 及び 46 kDa のタンパク質は 200,000 × g 上清画分に存在した (図 2)。続いて、*C. parvum* から AOX の活性であるユビキノール酸化酵素活性を測定したところ、粗ミトソーム画分より活性を検出し(比活性; 50 nmol/min/mg)、AF により阻害された。AOX は 39 kDa と予測されるが、ウェスタンブロットの解析と比較すると、28 kDa、65 kDa のタンパク質が AOX である可能性が示唆された。sliding window iteration of TargetP (SWIT) 解析により N 末端側から 150 アミノ酸を TargetP でシグナル予測を行い、その操作を 1 アミノ酸ずつスライドさせて解析した結果、N 末端側から 14, 50, 131 アミノ酸のいずれかの部位で切断される可能性が予測された。N 末端側から 50 アミノ酸で切断された場合の予想分子量は 32 kDa であるが、AOX は疎水性が高く、実際の分子量より早く SDS-PAGE で泳動される傾向があることから、28 kDa のタンパク質が AOX である可能性が高いと考えている。

本研究は AOX が *C. parvum* のミトソームに存在する酵素の生理活性として初めての報告になると同時に、AOX がミトソームに局在する生物として初めての報告である。*C. parvum* 自身からも AF 感受性のシアン耐性ユビキノール酸化酵素活性が検出されたことにより、大腸菌での組換え *C. parvum* AOX 発現系が *C. parvum* における反応を反映することを示している。

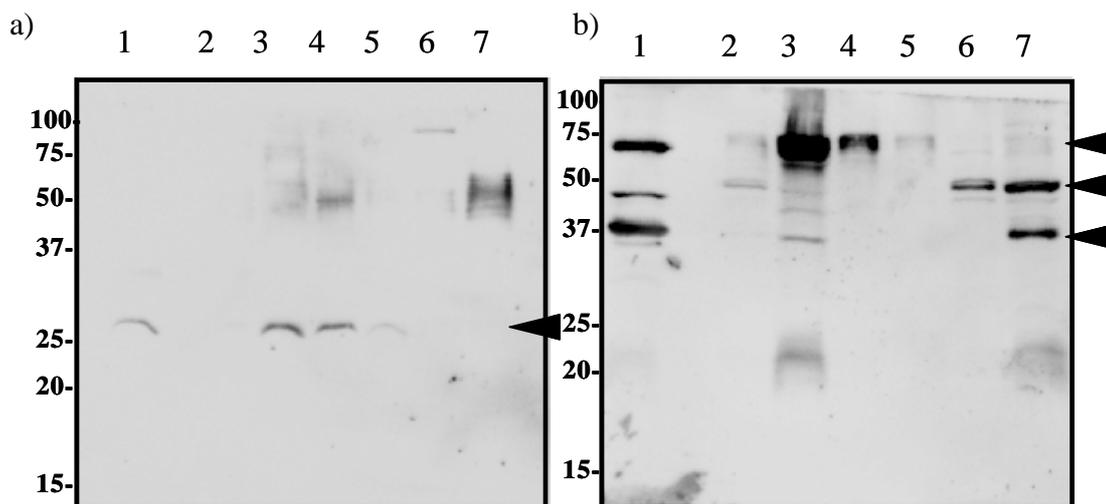


図2 抗 *C. parvum* AOX 抗体の発現と局在 (ウエスタンブロット)

AOX の局在を解析するために細胞分画後の画分を用いてウエスタンブロットを行った。a) 抗体 A を用いたウエスタンブロット。b) 抗体 B を用いたウエスタンブロット。レーン 1: 1×10^6 オーシスト、レーン 2: 1×10^6 ライセート、レーン 3: $900 \times g$ 沈殿画分、レーン 4: $5,000 \times g$ 沈殿画分、レーン 5: $12,000 \times g$ 沈殿画分、レーン 6: $200,000 \times g$ 沈殿画分、レーン 7: $200,000 \times g$ 上清画分。 $200,000 \times g$ 上清画分はアセトン沈殿で濃縮した。レーン 3~7 は 1×10^7 のオーシストに相当する試料を泳動した。抗体 A では 28 kDa のタンパク質と、抗体 B では 39 kDa・46 kDa・65 kDa のタンパク質と反応した。

3. 組換え *C. parvum* AOX に対するアスコフラノン誘導体の構造活性相関解析

抗クリプトスポリジウム症新規薬剤として有望な AF はヒト及び家畜の両方に対して需要が見込まれ、普及するにはコストの低い薬が望まれる。AF は全合成が可能となったものの、反応ステップ数が多く収率が悪いため工業化の難易度が高い。AOX の阻害に必要な構造に関する情報基盤を整える必要があり、組換え *C. parvum* AOX を用いた構造活性相関解析を行った。これまでに 45 化合物による構造活性相関解析が行われていたが、より効果の強い阻害効果を示す化合物を見出し、酵素と阻害剤の関係の結合様式の理解を深める目的で、さらに 66 の AF 誘導体の構造活性相関解析を行った。

構造活性相関解析には *C. parvum* 発現大腸菌膜画分を用い、一次スクリーニングとして 50% 阻害濃度 (IC_{50}) が 5 nM 以下と考えられる化合物を選出し、35 化合物の IC_{50} を決定

した。AFは芳香環とゲラニル構造を持つリンカー部位、そして不斉炭素を持つフラノン環の3つの部分から構成されているが(図3)、リンカー構造とフラノン環が必須ではなく、芳香環の構造が最も重要であることがわかった。AFの芳香環置換基の全て(ホルミル基・メチル基・クロロ基・ヒドロキシ基)を持つことが望ましいが、特にクロロ基が必須であり、ホルミル基はアセチル基に置換可能であることがわかった。ホルミル基が哺乳類体内において非常に代謝されやすく、薬剤開発において除くべき官能基である点を考慮すると有用な知見である。

アフリカ睡眠病の病原体であるトリパノソーマのAOX(TAO)と*C. parvum* AOXは49%のアミノ酸配列の相同性を持つ。TAOに対するAF誘導体の構造活性相関解析との比較から、両者に対するAF誘導体のAOX阻害活性はほぼ同じ傾向を示した。一部、クロロ基の重要性に差があることが示されたが、基本的にはAFをリード化合物とした薬剤はクリプトスポリジウム症とアフリカトリパノソーマ症の両方に効果を持つことが示された。今後、原虫を用いた*in vitro*実験においてAF誘導体の構造活性相関を調べる必要がある。

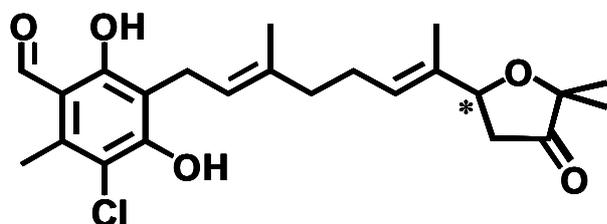


図3 AFの構造

AFは芳香環、リンカー、フラノン環から構成される。芳香環にはヒドロキシ基・ホルミル基・メチル基・クロロ基の官能基が存在し、リンカーはゲラニル構造を有す。フラノン環には不斉炭素が存在している。

今後、これまで薬剤のなかったクリプトスポリジウム症に対する新規薬剤としてのAFの実用化のみならず、アピコンプレックス門におけるAOXやマイトソームの生理的意義の解明など基礎・臨床の両者に関わる重要な成果が期待される。