

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07474

研究課題名(和文) 寄生原虫トリパノソーマに対する創薬標的の探索

研究課題名(英文) Searching for a drug target against parasitic protozoa, Trypanosoma

研究代表者

高木 悠友子 (Takagi, Yuko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：50783669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,560,000円

研究成果の概要(和文)：「顧みられない熱帯病」の一つであるシャーガス病は、病原因虫のクルーズトリパノソーマを昆虫ベクターが媒介することによりヒトに感染する。中南米を中心に年間1万2000人ほどが死亡している。現行の治療薬は強い副作用を伴い、慢性期の患者には効かないため、新たな薬剤の開発が強く求められている。

本研究では、クルーズトリパノソーマの創薬標的の探索を行った。CRISPR/Cas9システムを利用して標的候補を複数ノックアウトし、クルーズトリパノソーマの必須遺伝子を特定した。更に遺伝子産物を大腸菌で大量発現し、創薬に繋がる次のステップとなる阻害剤のスクリーニングや結晶構造解析へと繋げることができた。

研究成果の概要(英文)： Chagas' disease, one of "Neglected Tropical Diseases," is caused by a pathogenic protozoa called *Trypanosoma cruzi* via insect transmission. About 12,000 people die annually due to this disease, mainly in Latin America. Development of a new drug is a pressing matter, since current drugs are accompanied by serious side effects and are not effective for patients in the chronic phase.

In this study, we searched for a drug target against *Trypanosoma cruzi*. We knocked out several candidate target genes using CRISPR/Cas9 system, and identified essential genes for the parasite survival. We also cloned the gene for protein overexpression in bacteria, and started inhibitor screening and crystal structure analysis, which are the next step leading to drug development.

研究分野：分子生物学

キーワード：感染症 創薬標的 遺伝子 原虫 熱帯病

1. 研究開始当初の背景

「顧みられない熱帯病」の一つであるシャーガス病は、病因原虫のクルーズトリパノソーマを昆虫ベクターが媒介することによりヒトに感染する (Fig 1)。罹患者の3人に1人はその後数年から数十年にわたる潜伏期間を経て慢性期症状を発症し、心臓合併症などにより突然死に至る。これにより中南米では年間12,500人が亡くなっている[1]。

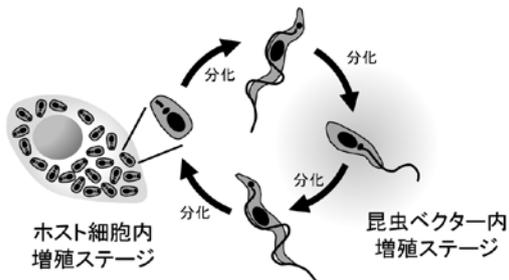


Fig 1. クルーズトリパノソーマの生活環。本研究では昆虫ベクター内の増殖ステージである「エビマスティゴート」を使用する。

シャーガス病の治療薬としては主に二種類の薬剤が知られているが、いずれの薬も数ヶ月の投与期間を要し4割の患者で強い副作用が発生する[2]。しかし他に良い選択肢がないために長年使い続けられてきた。しかもこれらの薬剤は、慢性期の患者では5割程度でしか改善がみられず、完治するケースは2割に留まる[3]。このため、副作用が少なく慢性期症状にも対応できる新たな薬剤の開発が強く求められている。

クルーズトリパノソーマは代表的なモデル生物とは異なる細胞機構をもっているため、遺伝学的なツールに乏しい。このため創薬標的となる必須遺伝子の探索をするのは難しかった。しかし近年、CRISPR/Cas9の技術を利用した遺伝子改変がクルーズトリパノソーマにおいても有効であることが示され[4,5]、この原虫における研究手法の多様化への可能性が大いに開かれた。とはいえ、新規な手法であるためにスタンダードプロトコルは確立されておらず、それぞれの研究室で独自に手法を模索しているのが現状である。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、シャーガス病の病因原虫クルーズトリパノソーマにおいて将来の創薬に繋がるような創薬標的遺伝子の探索を行うのが本研究の目的である。CRISPR/Cas9システムを取り入れることにより、近縁の原虫で必須とされる遺伝子がクルーズトリパノソーマにおいても創薬標的となり得るかを検証することが一つ目の目標である。更に、特定された必須遺伝子の大量発現に向けてクローニングを行い、その後の結晶構造解析や阻害剤のスクリーニングなどの創薬ステップへと繋げてゆくことが二つ目の目標である。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9システムによるノックアウトを効率的かつ安定的に行うことができるよう、遺伝子組換え原虫株やguide RNA (gRNA)の導入条件などを検討し、手法のルーチン化を図る。

(2) 近縁のブルーストリパノソーマから得られた知見をもとに必須遺伝子候補をノックアウトし、創薬標的となり得るクルーズトリパノソーマの遺伝子を特定する。

(3) バクテリアで標的タンパク質を発現、精製し、結晶化に足る収量を得られるか、また阻害剤のスクリーニングを行えるような酵素活性があるかを確認する。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9によるノックアウト

エレクトロポレーション条件やgRNA量の検討などにより、GFPをコントロールターゲットとした実験において常に95%ほどのノックアウト効率を高い生存率で達成できる

ようになった (Fig 2)。これにより、クルーズトリパノソーマにおける CRISPR/Cas9 ノックアウトのルーチン化に成功したと言える。

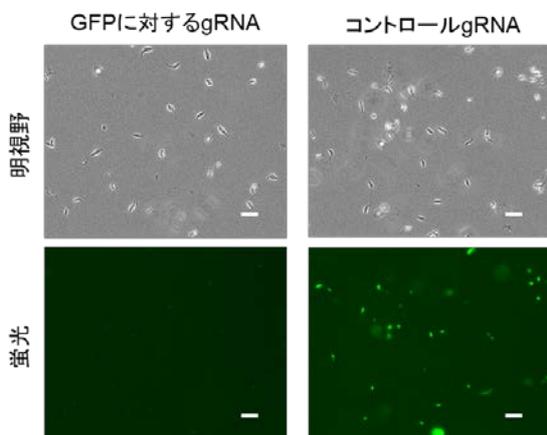


Fig 2. GFP をモデルターゲットにしたノックアウト実験。CRISPR/Cas9 発動後 1 日目の顕微鏡画像を比較。

(2) 必須遺伝子の選定

クルーズトリパノソーマとは違い RNAi が機能する近縁の原虫ブルーストリパノソーマでは、必須遺伝子に関する数多くの報告がある。その中から、全ての感染ステージにおいて原虫に必須であると推定される遺伝子を創薬標的候補として選定し、クルーズトリパノソーマのホモログ遺伝子をエピマステイゴートステージの原虫でノックアウトした。

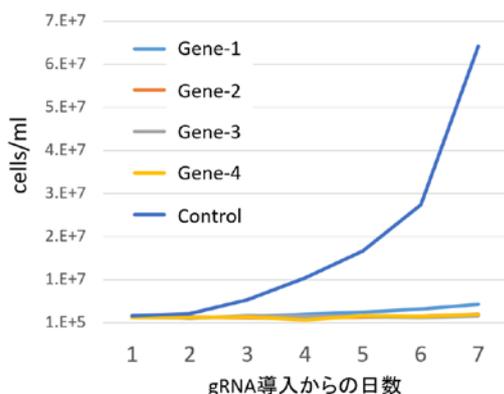


Fig 3. 各遺伝子に対する gRNA を導入した後の原虫細胞数の推移。

ターゲット遺伝子 (未発表のため Gene-1 から 4 と呼称する) に対する gRNA を導入す

ると、全てのケースにおいて原虫の成長が阻害された (Fig 3)。対して、クルーズトリパノソーマのゲノム配列にホモロジーのないコントロール gRNA は原虫の成長を阻害しなかった。また、必須遺伝子に対する gRNA を導入された原虫は細胞分裂に異常をきたし、鞭毛の数異常や核の分裂異常、細胞肥大など、奇形になる様子も観察された (Fig 4)。

これにより、ブルーストリパノソーマの必須遺伝子がクルーズトリパノソーマにおいても必須であることの検証に成功した。

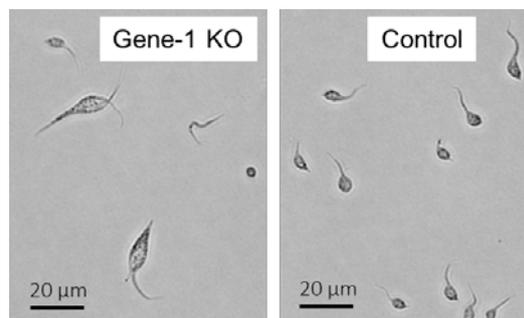


Fig 4. 遺伝子 Gene-1 ノックアウト後の原虫の形状変化。gRNA 導入後 2 日後の顕微鏡画像を比較。

(3) 阻害剤の特定に向けて

上記 4 つの創薬標的候補から、バクテリアにおける組換えタンパク質の発現の容易さと、酵素アッセイが比較的手軽にできることを踏まえ、標的遺伝子 Gene-1 について化合物スクリーニングを行った。使用したライブラリのうち、Thermal Shift Assay において 21 の化合物で標的タンパク質との相互作用が確認できた。更にそのうち 10 の化合物では酵素の活性阻害効果が確認できた。

今後は、結晶構造解析の専門家と協力しながら、この中で特に阻害効果が強かった化合物について酵素との共結晶構造を解析する予定である。阻害のメカニズムが明らかになれば、将来的には更に相互作用の強い化合物へと合成展開ができると期待される。

<引用文献>

1. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet. Elsevier; 2010;375: 1388-1402. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
2. World Health Organization (WHO). Fact sheet: Chagas disease (American trypanosomiasis). In: Washington: World Health Organization International [Internet]. 2017 [cited 28 Aug 2017]
3. Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. Drug Des Devel Ther. 2010;4: 243-53.
4. Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. MBio. 2015/01/01. American Society for Microbiology; 2015;6: e02097-14. doi:10.1128/mBio.02097-14
5. Lander N, Li Z-HH, Niyogi S, Docampo R. CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. MBio. 2015/07/23. American Society for Microbiology; 2015;6: e01012. doi:10.1128/mBio.01012-15

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① Yuko Takagi “Target-directed drug discovery: exploring parasite genes toward targeted antiprotozoal drug development.” NSTDA-AIST Joint Symposium on Bio-Innovations. March 14, 2017. Bangkok, Thailand

② Yuko Takagi, Naoyuki Kuwabara, Kiong Ho,

Hitoshi Sakashita, Koji Furukawa
“Inhibitor Screening against *Trypanosoma cruzi* RNA Triphosphatase.” Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting. April 22-26, 2017. Woods Hole, MA, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 悠友子 (Yuko Takagi)

産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号 : 50783669