

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15679

研究課題名(和文)アスコフラノン生合成経路中の前駆体群の寄生虫学的評価に基づく薬剤開発基盤

研究課題名(英文)Parasitological evaluation of precursors in Ascofuranone biosynthesis pathway

研究代表者

城戸 康年(Kido, Yasutoshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90511395

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): Trypanosoma bruceiが生存するために必須であるTrypanosome alternative oxidase (TAO)の阻害剤アスコフラノン(AF)は微生物由来のメロテルペノイド化合物である。本研究では、AF生合成の全容解明と、全合成経路でのAF前駆体の抗トリパノソーマ活性評価を実施した。AF産生菌のゲノム解析から候補遺伝子群を見出した後に、AF生合成経路および、その中間体を同定できた。この中間代謝物がイリシコリンAという天然物であることがわかったが、この中間体も強い抗トリパノソーマ活性を有することがわかり、薬剤開発の基盤となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、抗トリパノソーマ薬であるアスコフラノンの生合成経路の解明とその中間代謝物抗トリパノソーマ活性を見出すことができた。さらに、AF前駆体であることがわかったIllicicolin Aは、抗トリパノソーマ活性のみならず様々な生理活性を有する多くのテルペノイドの共通前駆体であり、天然物化学としても非常に意義がある。AF生合成経路を解析することで、薬剤開発に重要な部分構造の生合成経路を見出すことができ、より広い抗原虫スペクトラムを有するより多くの天然物を見出す基盤となった。また、この生合成経路を利用したAF産生にも応用でき、産業への発展の基礎となる。

研究成果の概要(英文): Trypanosome alternative oxidase (TAO) is essential for the survival of Trypanosoma brucei, the causative agent of Human African Trypanosomiasis. Ascofuranone (AF), which is a microbial-derived meroterpenoid compound, is a potent inhibitor of the enzyme. In this study, we have elucidated the whole AF biosynthesis pathway in the fungi after we have identified the candidate gene clusters from the genome of AF-producing fungi. We have also evaluated the anti-trypanosomal activity of AF precursors found in that pathway. One of those precursors, illicicolin A, was proved to be one of the most potent anti-trypanosomal derivative. The biosynthesis pathway to produce AF and its derivatives would contribute to further drug development.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トリパノソーマ アスコフラノン生合成 Alternative Oxidase シアン耐性酸素呼吸 顧みられない熱帯病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Trypanosoma brucei はアフリカトリパノソーマ症の病原体となり、アフリカ大陸で甚大な被害をもたらしているが、現在の治療薬は治療効果も不十分な上に、副作用が強く、新規薬剤開発が強く望まれている。代表者らは、*T. brucei* が特殊なエネルギー代謝系を有することで宿主血流中の環境に適応するための分子基盤の解析をすすめてきた。寄生適応代謝の鍵酵素であるミトコンドリア内膜に存在する末端酸化酵素 Trypanosome alternative oxidase (TAO) が、原虫の生存に必須であり、宿主である哺乳類には存在しないため、格好の薬剤標的と考え、0.1 nM という低濃度で TAO を阻害するアスコフラノン(AF)という糸状菌の 2 次代謝産物を報告してきた。これまでに申請者らはエネルギー代謝系の分子基盤の解明、AF の阻害機構の解析、実用化に向けた研究を行ってきた。

(1) 薬剤標的である TAO の AF による阻害機構の解析

TAO の三次元構造解析に成功し、AF と TAO の相互作用を分子レベルで明らかにした。これにより、TAO を標的とした AF 誘導体の薬剤設計が可能となった(Shiba T*, Kido Y*, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)

(2) アスコフラノン誘導体を用いた構造活性相関研究

約 200 個のアスコフラノン誘導体を用いて、酵素レベル、原虫レベルで薬効を確認し、薬理学的活性中心を明らかにした(Saimoto H, Kido Y*, et al. J Biochem. 2013)

(3) 感染動物の治療効果

AF は、*T. brucei* 感染マウスを完治させる

2. 研究の目的

Trypanosoma brucei が宿主血流中で生存するために必須であるミトコンドリア内膜に存在する末端酸化酵素 Trypanosome alternative oxidase (TAO) と、その特異的阻害剤アスコフラノン(AF)との相互作用、TAO の生化学的解析や生理的意義を解明してきた。さらに、この分子基盤をもとに *T. brucei* 感染マウスの治療実験にも成功したが、AF およびその誘導体が十分量えられず、さらなる薬理学的評価が停滞していた。そこで、本研究では、AF 生合成の全容解明と、全合成経路での AF 前駆体の抗トリパノソーマ活性など寄生虫学的評価を行い、基礎研究に基づいた薬剤開発基盤の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、AF 生合成経路の解明と、生合成経路の解明で明らかになる AF 生合成前駆体の薬理学的評価を行うことで、AF 関連天然物群と TAO の相互作用を解明し、今後の薬剤開発の基盤を確立する。効率的に研究を進行するために、化合物の化学的特性に基づいた精密な生合成経路の予測を行った。また、生合成経路の解明には遺伝子再構成法と遺伝子改変法による 2 方面からのアプローチをとった。AF 前駆体の単離を行い、AF 前駆体群の抗トリパノソーマ活性を明らかにした。AF の全生合成経路を解明し、中間代謝物を起点とする AF 誘導体の抗トリパノソーマ活性を明らかにした。

4. 研究成果

本研究では、AF 生合成経路の解明と、生合成経路の解明で明らかになる AF 生合成前駆体の薬理学的評価を行うことで、AF 関連天然物群と TAO の相互作用を解明した。

(1) AF 生合成経路の解明

AF 産生菌のゲノム解析から得られた情報を用いて、AF 生合成に関わる 8 つの遺伝子から構成される遺伝子群を同定できた。この予測生合成経路とその中間代謝物の化学構造と、8 つの遺伝子群の情報に基づいて、遺伝子再構成法のアプローチにより、AF 生合成経路中の中間体をすべて同定でき、これまでにすべての生合成経路が解明できた。

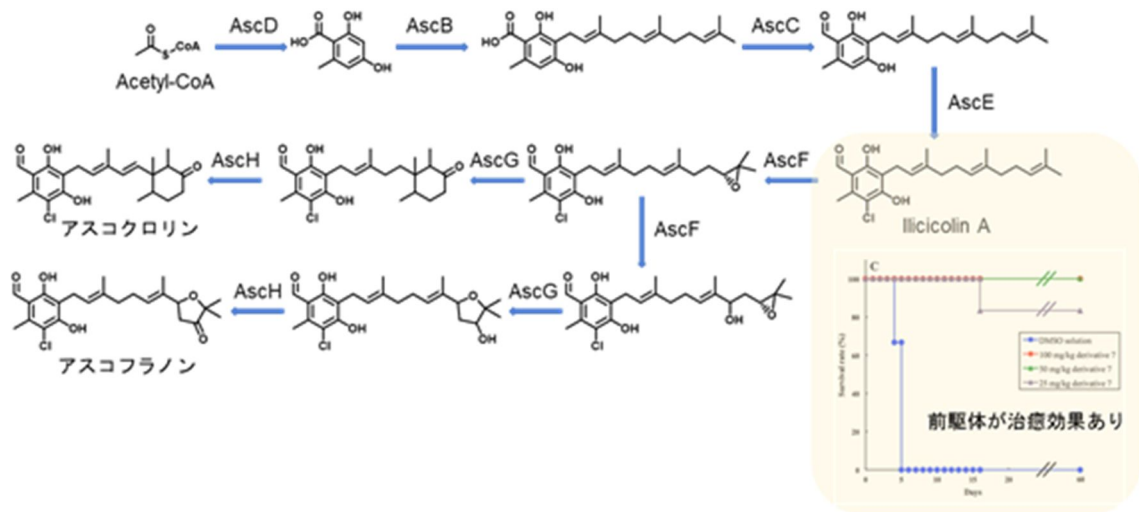
AF だけではなく、その副産物であるアスコクロリンも含めた生合成経路が明らかとなった。生合成経路は、共通の前駆体から特異な酸化酵素とテルペン環化酵素によって二つの生合成系が分岐する経路だった。さらに、この中間代謝物がイリシコリン A という天然物であることがわかり、これも強い抗トリパノソーマ活性を有することがわかった。これら生合成経路の中間代謝物の寄生虫学的な評価を実施、薬剤開発に応用できるかどうかの検証も行った。

以下の 3 点が明らかとなった。

AF 産生菌 *A. sclerotigenum* の AF 高産生条件と AF 低産生条件の各遺伝子の発現倍率の差を解析することにより、AF 生合成関連遺伝子群を同定した

AF 産生しない *Aspergillus oryzae* に候補遺伝子を導入し生成物を同定する遺伝子再構成法により、アスコクロリンと AF 生合成経路を明らかにできた(下図)

AF 生合成経路中の AF 前駆体(Ilicicolin A)を用いて抗トリパノソーマ活性について評価したところ、AF より低濃度でマウスの治療に成功した



(2) 代謝リモデリングを利用した中枢感染病態モデルにおける治療反応性

TAO 阻害剤アスコフラノンの誘導体の中から、グリセロールを併用しなくとも単剤で、急性感染動物モデルを治癒する化合物を見出した。この誘導体は、アスコフラノン生合成経路の中間体の 1 つであることも明らかとなった。これによりアスコフラノン産生系菌株の培養による生産も可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Araki Yasuko, Awakawa Takayoshi, Matsuzaki Motomichi, Cho Rihe, Matsuda Yudai, Hoshino Shotaro, Shinohara Yasutomu, Yamamoto Masaichi, Kido Yasutoshi, Inaoka Daniel Ken, Nagamune Kisaburo, Ito Kotaro, Abe Ikuro, Kita Kiyoshi	4. 巻 116
2. 論文標題 Complete biosynthetic pathways of ascofuranone and ascochlorin in <i>Acremonium egyptiacum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 8269-8274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1073/pnas.1819254116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiba Tomoo, Inaoka Daniel Ken, Takahashi Gen, Tsuge Chiaki, Kido Yasutoshi, Young Luke, Ueda Satoshi, Balogun Emmanuel Oluwadare, Nara Takeshi, Honma Teruki, Tanaka Akiko, Inoue Masayuki, Saimoto Hiroyuki, Harada Shigeharu, Moore Anthony L., Kita Kiyoshi	4. 巻 1860
2. 論文標題 Insights into the ubiquinol/dioxygen binding and proton relay pathways of the alternative oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 375 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbabi.2019.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Yukiko, Inaoka Daniel K., Shiba Tomoo, Saimoto Hiroyuki, Sakura Takaya, Amalia Eri, Kido Yasutoshi, Sakai Chika, Nakamura Mari, Moore Anthony L., Harada Shigeharu, Kita Kiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Selective Cytotoxicity of Dihydroorotate Dehydrogenase Inhibitors to Human Cancer Cells Under Hypoxia and Nutrient-Deprived Conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fphar.2018.00997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Balogun Emmanuel Oluwadare, Inaoka Daniel Ken, Shiba Tomoo, Tokuoka Suzumi M., Tokumasu Fuyuki, Sakamoto Kimitoshi, Kido Yasutoshi, Michels Paul A.M., Watanabe Yoh-Ichi, Harada Shigeharu, Kita Kiyoshi	4. 巻 1861
2. 論文標題 Glycerol kinase of African trypanosomes possesses an intrinsic phosphatase activity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 2830 ~ 2842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2017.07.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 城戸 康年、杉浦 悠毅、稲岡 健ダニエル、Daniel Don Nwibo、齋本 博之、山本 雅一、上村 尚人、金子 明、北 潔
2. 発表標題 Trypanosoma bruceiのnon-targetedメタボローム解析と抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの作用機構解析
3. 学会等名 日本寄生虫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasutoshi KIDO, Daniel Ken INAOKA, Tomoo SHIBA, Shigeharu HARADA, Hiroyuki SAIMOTO, Naoto UEMURA, Kiyoshi KITA
2. 発表標題 Drug development for human African trypanosomiasis targeting its cyanide-insensitive respiration
3. 学会等名 20th European Bioenergetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城戸 康年、稲岡 健ダニエル、松崎 素道、志波 智生、原田 繁春、齋本 博之、山本 雅一、上村 尚人、北 潔
2. 発表標題 シアン耐性呼吸を標的とした抗トリパノソーマ薬の臨床試験へむけて
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasutoshi KIDO, Daniel Ken INAOKA, Motomichi MATSUZAKI, Tomoo SHIBA, Shigeharu HARADA, Hiroyuki SAIMOTO, Masaichi YAMAMOTO, Naoto UEMURA, Kiyoshi KITA
2. 発表標題 Towards clinical trial of anti-African trypanosomiasis drug targeting cyanide-insensitive respiration
3. 学会等名 8th Meeting ACETOTRYP/GLYCONOV (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	北 潔 (Kita Kiyoshi) (90134444)	長崎大学・熱帯医学グローバルヘルス研究科・研究科長 (17301)	
研究協力者	松崎 素道 (Matsuzaki Motomichi) (00511396)	国立研究開発法人理化学研究所・革新知能統合研究センター・研究員 (82401)	