

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19370043

研究課題名（和文） トリパノソーマ及びマラリアの新規治療薬を目指したキーとなる酵素の構造解析

研究課題名（英文） Studies on protein structure of key enzymes from trypanosoma and malaria for the development of new drugs.

研究代表者

芳本 忠 (YOSHIMOTO TADASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：6008887

研究代表者の専門分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：トリパノソーマ、マラリア、酵素、立体構造

1. 研究計画の概要

アフリカ睡眠病やマラリア病は患者数が多いにも関わらず、有効な治療薬の開発が遅れている。本研究ではトリパノソーマやマラリアの持つキーとなる酵素を感染防御のターゲットし、それらに対する特異的阻害剤を治療薬の開発を目指す。

(1) マラリアには古くからキニーネが用いられ、クロロキンなど合成薬が開発されてきたがこれも耐性の出現で問題となっている。マラリアのメチオニンアミノペプチダーゼ遺伝子をノックアウトすると致命的となり、細胞分裂に関与するとされているので、この酵素を治療薬開発のターゲットとした。

(2) トリパノソーマに感染すると、初期に発熱や筋肉の痙攣、知覚異常などの感覚障害を示し、中期に心病変、腎不全などの臓器障害、感染後期には徐々に意識レベルが低下し精神障害、または昏睡状態となって死に至る。このような放出されたオリゴペプチダーゼBが心房性Na利尿ペプチドといった調節ペプチドを分解してしまうことで、ホストの代謝ホメオスタシスに重篤な影響を与えてしまうと考えられている。そのためトリパノソーマ感染の治療薬としてこの酵素をターゲットとした。

(3) 基質特異性の広いアミノペプチダーゼN：病原微生物は高いアミノペプチダーゼN活性を持ち、ペプチド代謝により

アミノ酸へ分解し栄養摂取を行っている。アミノペプチダーゼNを強力に酵素阻害することにより兵糧攻めにする事による治療薬の可能性が考えられた。そのため、アミノペプチダーゼNを共通のターゲットとした。

2. 研究の進捗状況

(1) マラリアのメチオニンアミノペプチダーゼ：本研究では酵素に特異的な阻害剤を開発し治療薬として利用しようとするものである。本年は酵素遺伝子をクローニングした。大腸菌で活性ある状態で発現した。得られた酵素に特異的な阻害剤を得た。

(2) トリパノソーマのオリゴペプチダーゼB：酵素の結晶化を行い、構造解析中である。更に、院内感染菌の *Stenotrophomonas maltophilia* のジペプチジルアミノペプチダーゼIVを精製、結晶化して酵素のX線結晶解析を行った。本酵素とオリゴペプチダーゼBは類似の基質特異性とアミノ酸配列のホモロジーを持つことからオリゴペプチダーゼBの構造や機能を推定した。

(3) アミノペプチダーゼNに対する特異的阻害剤：酵素作用の中間体に類似の化合物としてPL250を開発した。また、酵素と阻害剤との複合体のX線結晶構造解析により、詳細な活性部位へ結合状態を明らかにすることができた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(1) マラリアのメチオニンアミノペプチダーゼ阻害：阻害剤をハイスループットスクリー

ニング法で行った。その結果、XC11 化合物が 112nM の阻害を示した。XC11 はマラリアのメチオニンアミノペプチダーゼに高い選択性を示した。更に重要なことに、多剤耐性のマラリアに感染させたマウスを用いた生存率実験で XC11 は有効な抗マラリア作用を示し順調である。

(2) オリゴペプチダーゼ B : 酵素の結晶解析を行い、結晶パラメータ、格子定数 $a = b = 123.9, c = 248.0 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$ を持つ、単純格子の三方晶系(*P* hexagonal)に属する結晶系であることを明らかにできたが、構造解析には暫く時間が必要である。

(3) アミノペプチダーゼ N に対する特異的阻害剤：病原微生物は高いアミノペプチダーゼ N 活性を持ち、ペプチド代謝によりアミノ酸へ分解し栄養摂取を行っている。今回、酵素作用の中間体に類似の化合物として PL250 を開発した。酵素-阻害剤複合体構造解析から、活性亜鉛イオンは His297, His301, Glu320 と配位し、更に阻害剤のリン酸と結合する O とも配位していた。また、Tyr381 と水素結合し、安定化に作用する機構が明らかになったことは順調である。

4. 今後の研究の推進方策

(1) マラリアのメチオニンアミノペプチダーゼ：阻害剤のスクリーニングを続け新しい医薬品候補を探る。酵素の結晶化を行い、立体構造を明らかにする。

(2) トリパノソーマ由来のオリゴペプチダーゼ B : 酵素の結晶解析を行い、重原子置換法を用い位相決定を行い立体構造を明らかにする。

(3) アミノペプチダーゼ N : トリパノソーマ及びマラリアより酵素を精製し、酵素科学的性質を明らかにする。酵素に特異的な阻害剤の開発をおこなう。

(4) トリパノソーマ及びマラリアから新たなターゲットを探す。プロリルオリゴペプチダーゼ、プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼ及び DP-IV 活性を持つかを調べ、cDNA ライブラリーより酵素遺伝子を得る。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Xu, Y., Nakajima, Y., Ito, K., Zheng, H., Oyama, H., Heiser, U., Hoffmann, T., Gärtner, U-T., Demuth, H-U., and Yoshimoto, T., Novel Inhibitor for Prolyl Tripeptidyl aminopeptidase from *Porphyromonas gingivalis* and details of substrate-recognition mechanism. *J. Mol. Biol.*, **375** (3), 708-719 (2008)

- ② Nakajima, Y., Ito, K., Toshima, T. Egawa, T., Zheng, H., Oyama, H., Wu, Y-F., Takahashi, E., Kyono, K., and Yoshimoto, T., Dipeptidyl aminopeptidase IV from *Stenotrophomonas maltophilia* exhibited an activity against substrate containing 4-hydroxyproline residue. *J. Bacteriol.* **190** (23) 7819-7829 (2008)

- ③ Nakashima, K., Ito, K., Nakajima, Y., Yamazawa, R., Miyakawa, S., and Yoshimoto, T., Closed Complex of the D-3-Hydroxybutyrate dehydrogenase induced by an enantiomeric competitive inhibitor: Importance of Gln196 in stable ternary complex formation. *J. Biochem.* **145**, (4) 467-479 (2009)

- ④ Fournié-Zaluski, M.C., Poras, H., Roques, B P., Nakajima, Y., Ito, K., and Yoshimoto, T., Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* complexed with the transition state analogue aminophosphinic inhibitor PL250, *Acta Crystal. D.* **65**, 814-822 (2009)

- ⑤ Yamashita, K., Nakajima, Y., Matsushita, H., Nishiya, Y., Yamazawa, R., Wu, Y., Matsubara, F., Oyama, H., Ito, K., and Yoshimoto, T., Substitution of Glu122 by glutamine revealed the function of the second water molecule as a proton donor in the binuclear metal enzyme, creatininase, *J. Mol. Biol.* **396**, 1081-1096 (2010)

[学会発表] (計 29 件)

- 1、「*Streptococcus* 由来プリンスクレオシドホスホリラーゼの構造と基質特異性」
武吉 智也、中嶋 義隆、伊藤 潔、芳本 忠
平成 19 年度 第 24 回日本薬学会九州支部大会 2007/12/8-9 福岡 第一薬科大学講演要旨集 p84
- 2、「Hyp 基質に活性を示す *S. maltophilia* ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV の構造的特徴」 十島 翼、中嶋 義隆、伊藤 潔、尾山 廣、芳本 忠 平成 19 年度 第 24 回日本薬学会九州支部大会 2007/12/8-9 福岡 第一薬科大学講演要旨集 p85

他

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)