

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 0 4 2 9

研究課題名 (和文) 病原性原虫における含硫アミノ酸分解酵素の生理的役割と反応メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Reaction mechanisms and physiological roles of sulfur-containing amino acids degradation enzyme in pathogenic protozoa.

研究代表者

佐藤 暖 (SATO DAN)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・助教

研究者番号：5 0 4 6 8 4 7 7

研究成果の概要 (和文): 赤痢アメーバ症は世界で最も深刻な感染症の一つである。私たちは赤痢アメーバ原虫に存在して人にはない酵素である「含硫アミノ酸分解酵素」に着目し、その反応機構、薬剤標的としての意味付け、および生理学的な重要性を明らかにすることを試みた。研究の結果、この酵素の反応機構を結晶構造レベルで詳細に解析することに成功した。また、私たちが薬剤候補と考えている化合物がどのように殺アメーバ作用を示すか明らかにした。本研究は新規抗アメーバ薬剤を開発する上で有用な情報をもたらすと期待される。

研究成果の概要 (英文): Amoebiasis is one of the major infectious diseases worldwide. We focus on the sulfur-containing amino acids degradation enzymes, which present exclusively in the pathogen but missing in humans. We investigated the reaction mechanism, the characterization as a drug target, and physiological roles of the enzymes. We successfully elucidated the reaction mechanism at crystal structure level, and demonstrated that how the lead compounds exhibited the toxicity to amoeba. Our research will provide the valuable information on the rational design of novel anti-amoebic drugs.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：寄生性原虫・創薬開発・含硫アミノ酸・結晶構造解析・メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバ症は発展途上国を中心に年間

5000 万人が感染し、死亡者数は 4~7 万人に達すると推定される。日本の感染者数は近年

増加しており、年間数百件の症例報告がある。本症を引き起こす寄生性原虫 *Entamoeba histolytica* は腸管内で炎症を引き起こし、一部は組織に侵入して膿瘍を形成する。本症に対する薬剤は組織に侵入した原虫にのみ有効で腸管内の原虫には効果がなく、さらに薬剤耐性株の出現も示唆されていることから、新規抗アメーバ薬の開発は緊急の課題である。

本原虫は含硫アミノ酸（メチオニンやシステインなど）をケト酸・アンモニア・チオールに分解する酵素メチオニン - リアーゼ（MGL）を持つ。本酵素はヒトには存在しないことから有望な創薬標的として期待できる。研究代表者らはメチオニンの類似体トリフルオロメチオニン（TFM）が顕著な殺アメーバ作用を示すことを明らかにしている。TFM を出発材料として殺アメーバ薬を開発する上で、MGL の酵素学的特徴（特に基質の分解メカニズム）および原虫内での生理的役割を明確にすることは極めて重要である。本原虫は基質特異性が多少異なる 2 種類の MGL（MGL1 と MGL2）を持つが、酵素学的パラメーターを詳細に比較しても MGL2 が存在する理由を明確にできなかった。しかし MGL1 と MGL2 はほぼ等量発現していることから、MGL1 では代用できない何らかの役割を MGL2 は担っているはずである。また、TFM は MGL1 より MGL2 によってよく分解されることから、MGL2 の生理的役割は解明すべきである。

MGL1 と MGL2 の基質特異性と一時構造レベルを明らかにすることも試みた。細菌（*Pseudomonas putida*）の MGL で提唱されている反応機構を参考に変異体を作製して酵素活性を調べたところ、補酵素ピリドキサル 5'リン酸の近くに位置するシステイン残基が基質特異性に重要な意味を持つことが判明した。しかしこのシステイン残基が具体的にどのように基質に作用するのかは未解決である。また、TFM に対する反応性の違い（前述のように TFM は MGL1 より MGL2 によってよく分解される）は、このシステイン残基および他の残基の変異でもうまく説明ができなかった。

2 . 研究の目的

赤痢アメーバ原虫の MGL の反応機構と生理的役割を明らかにし、新規抗アメーバ薬開発に役立つ情報を得る。

3 . 研究の方法

大別して以下 2 つのアプローチから研究を進めた

- (1) 立体構造レベルでの MGL の反応メカニズムの解明。野生型と変異体の結晶構造を詳細に比較し、さらに酵素-基質複合体や反応中間体を作製して、反応過程の詳細な解析を試みた。
- (2) 基質や薬剤リード化合物をアメーバに与え、その挙動をメタボロミクス手法で解析し、MGL の生理的役割の解明と創薬標的としての特徴付けを行った。

4 . 研究成果

- (1) 立体構造レベルでの MGL の反応メカニズムの解明

2 種類の MGL のうち一方（MGL1）の結晶化に成功した（もう一方はすでに結晶化済み）。両方を比較してみたところ、活性中心を構成するアミノ酸の位置関係に若干の違いが見られるが、それが基質特異性にどう関係するか明確に説明できなかった。これを明らかにするため酵素-基質複合体の作成を試みた。その結果、構造の異なる数種類の MGL1-メチオニンの複合体が得られた。それらを並べると反応過程を約 8 種類に区分することができた。その中にはいくつかの新規の反応が含まれる。他の酵素と比較しても、反応過程をこれほど詳細に結晶レベルで観察できたのは初めてである。

- (2) MGL の生理的役割の解明と創薬標的としての特徴付け

MGL は酵素学的特異性が際立っているにもかかわらず、生理学的役割はよく分かっていない。それを明らかにするため MGL に関連した代謝産物をメタボロミクス手法で観察した。赤痢アメーバ原虫は無機硫黄からエネルギーを使ってシステインを合成する経路を持つ一方で、MGL のはたらきで生じたチオールはそのまま体外へ排出されている。これはエネルギーの無駄に見えるので何らかの形で硫黄をリサイクルしていると予想し、標識されたメチオニンやセリンをアメーバに与えて代謝過程を詳細に解析したところ、メチオニンの分解で生じたチオールは、セリン由来の代謝産物と結合して S-メチルシステインになり、その量はシステイン欠乏下で増加することが判明した。

薬剤リード化合物 TFM の有効性を上げるため、誘導体化して殺アメーバ作用を検討した。酵素学的性質や結晶構造から TFM のカルボキシル基なら官能基の導入が可能であると判断し、そこに様々な官能基をつけた誘導体を作製して抗アメーバ作用を検討した。その結果、いくつかの化合物が既存の薬剤より優れた有

効性を示した。TFM 誘導体の作用メカニズムを明らかにするため代謝過程を調べたところ、TFM 誘導体はアメーバのプロテアーゼのはたらきでいったん TFM に変換されたのち毒性を示すと予想された。これらのことは今後の抗アメーバ薬の開発に役立つと考えられる。

5. 主な発表論文等

(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9件)

Afzal Husain, Dan Sato, Ghulam Jeelani, Fumika Mi-ichi, Vahab Ali, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Soga, and Tomoyoshi Nozaki. **Metabolome analysis revealed increase in S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.** Journal of Biological Chemistry. 285(50) 39160-39170. (2010). 査読有

佐藤 暖・野崎智義 赤痢アメーバ原虫に対するトリフルオロメチオニン誘導体の有効性 ビタミン Vol.84 No.5・6 250-254 (2010) 査読無

Dan Sato, Seiki Kobayashi, Hiroyuki Yasui, Norio Shibata, Takeshi Toru, Masaichi Yamamoto, Gensuke Tokoro, Vahab Ali, Tomoyoshi Soga, Tsutomu Takeuchi, Makoto Suematsu, and Tomoyoshi Nozaki. **Cytotoxic effect of amide derivatives of S-trifluoromethylhomocysteine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.** International Journal of Antimicrobial Agent. 35(1). 56-61. (2010) 査読有

Ghulam Jeelani, Afzal Husain, Dan Sato, Vahab Ali, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Soga, and Tomoyoshi Nozaki. **Two atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine and iron reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*.** Journal of Biological

Chemistry. 285(35) 26889-26899. (2010). 査読有

Afzal Husain, Ghulam Jeelani, Dan Sato, Vahab Ali and Tomoyoshi Nozaki. **Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba histolytica*.** Molecular and Biochemical Parasitology. 170(2). 100-104. (2010). 査読有

佐藤 暖・山形 渉・原田繁春・野崎智義 赤痢アメーバ原虫の薬剤標的酵素・メチオニン リアーゼ - 薬剤リード化合物・トリフルオロメチオニンと生理的基質に対する反応性 - ビタミン Vol.83 No.5・6 292-295 (2009) 査読無

Dan Sato and Tomoyoshi Nozaki. **Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers.** IUMBM Life. 61(11). 1019-1028. (2009). 査読有

Dan Sato, Tsuyoshi Karaki, Akira Shimizu, Kaeko Kamei, Shigeharu Harada and Tomoyoshi Nozaki. **Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine gamma-lyase 1 from *Entamoeba histolytica*.** Acta Crystallographica Section F. 64(Pt 8). 697-699. (2008). 査読有

Dan Sato, Wataru Yamagata, Shigeharu Harada and Tomoyoshi Nozaki. **Kinetic characterization of methionine gamma-lyases from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine, a promising lead compound against amoebiasis.** FEBS Journal. 275(3). 548-560. (2008). 査読有

[学会発表](計10件)

佐藤 暖、アフザル フセイン、ジラニグラム、末松 誠、曾我朋義、野崎智義 「腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおける L-システイン欠乏条件下でのメタボロー

ム解析」第5回メタボロームシンポジウム(山形県鶴岡市 2010年9月9-11日)

Dan Sato, Afzal Husain, Ghulam Jeelani, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Soga, Tomoyoshi Nozaki. **Metabolomic analysis of the human enteric parasite *Entamoeba histolytica*: Discovery of unique pathways and potential targets for chemotherapeutics.** The 6th Metabolomics Society Conference 2010 (Jun 27 - July1 2010, Amsterdam, the Netherlands)

Ghulam Jeelani, Dan Sato, Afzal Husain, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Soga, Tomoyoshi Nozaki. **Metabolomics of parasite differentiation: metabolomic profiling of the human enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* revealed activation of unpredicted pathways during differentiation of the proliferative into dormant stage.** The 6th Metabolomics Society Conference 2010 (Jun. 27 - July1 2010, Amsterdam, the Netherlands)

佐藤 暖、アフザル フセイン、ジラニ グラム、バハブ アリ、野崎智義 「赤痢アメーバ原虫のトレオニン脱水酵素の酵素学的解析」 日本ビタミン学会第62回大会(岩手県盛岡市 2010年6月11-12日)

アフザル フセイン、ジラニ グラム、佐藤 暖、見市文香、バハブ アリ、曾我朋義、末松 誠、野崎智義 「腸管寄生原虫赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答のメタボローム解析」 第4回メタボロームシンポジウム(神奈川県横浜市鶴見区 2009年11月18-19日)

Ghulam Jeelani, Afzal Husain, Dan Sato, Makoto Suematsu, Vahab Ali and Tomoyoshi Nozaki. **Biochemical and physiological function of a novel reductase from the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*.** The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. (Sep. 8 - 11 2009, Awaji, Japan)

Afzal Husain, Ghulam Jeelani, Dan Sato, Fumika Mi -ichi, Tomoyoshi Soga, Makoto Suematsu, Vahab Ali, Yasuyoshi Ike and Tomoyoshi Nozaki. **Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in enteric protozoan parasite *Entamoeba*** The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. (Sep. 8 - 11 2009, Awaji, Japan)

佐藤 暖、小林正規、安井宏有貴、柴田哲男、山本雅一、曾我朋義、竹内 勤、末松 誠、野崎智義 「赤痢アメーバ原虫に対するトリフルオロメチオニン誘導体の薬効について」 日本ビタミン学会第61回大会(京都府亀岡市 2009年5月30-31日)

佐藤 暖、アフザル フセイン、曾我朋義、末松 誠、野崎智義 「寄生性原虫の含硫アミノ酸代謝の重要性-メタボローム解析からのアプローチ-」 第3回メタボロームシンポジウム(山形県鶴岡市 2008年10月30日-11月1日)

唐木 剛、清水 顕、佐藤 暖、亀井加恵子、原田繁春、野崎智義 「硫黄含有アミノ酸生合成・分解経路を標的とする抗赤痢アメーバ薬の開発-メチオニンリアーゼの立体構造と阻害剤の結合様式-」 第7回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム(愛媛県松山市 2008年10月10日-11日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 暖 (SATO DAN)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・助教

研究者番号：50468477

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし