

平成 27 年 5 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790406

研究課題名(和文) 熱帯熱マラリア原虫由来代謝酵素を標的とした阻害剤スクリーニング系の構築

研究課題名(英文) Construction of the inhibitor screening system which target the enzyme from Plasmodium falciparum.

研究代表者

梅田 知伸 (UMEDA, TOMONOBU)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：80514471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗マラリア薬の創製を目指し、熱帯熱マラリア原虫由来酵素に対する阻害剤スクリーニング系の構築に取り組んだ。具体的には熱帯熱マラリア原虫の生育に必須な代謝経路である非メバロン酸経路に注目し、同経路において特に重要な酵素である1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase(DXR)を標的とした阻害剤スクリーニング系の構築を目指した。

スクリーニング系の構築には至らなかったが、研究協力者より新たに提供して頂いた数十種類の新規阻害剤との複合体の結晶化実験を行い、そのうち数種類の阻害剤との複合体の結晶を得ることに成功し、立体構造解析にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Aimed at creation of new anti-malarial drugs, I worked in the construction of inhibitor screening system for the enzyme from Plasmodium falciparum. Specifically, I focused on the non-mevalonate pathway, which is the essential metabolic pathway in the growth of Plasmodium falciparum. I aimed the construction of inhibitor screening system to target the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR), which is a particularly important enzyme in the pathway. Although not lead to the construction of the screening system, I performed crystallization experiments in complex with novel inhibitors which collaborators provided me. I tried crystallization experiments complexed with several inhibitors and succeeded in obtaining crystals. Finally I was succeeded in the three-dimensional structural analysis.

研究分野：構造生物学

キーワード：結晶構造解析 マラリア

1. 研究開始当初の背景

寄生原虫感染症であるマラリアは、世界中で毎年3億～5億人の感染者、100万～300万人の死者を出している。しかも、既存の抗マラリア薬に耐性を示す原虫の出現により、被害は拡大傾向にある。また、地球温暖化の影響などから、マラリアの発生が熱帯・亜熱帯地域のみならず温帯地域にまで迫っており、新規抗マラリア薬の開発は急務となっている。

ヒトに感染する4種類のマラリア原虫の中で、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) は最も危険な原虫である。そのゲノムの塩基配列にはAT含量が80%を超えるという特徴があるため、熱帯熱マラリア原虫由来タンパク質の発現は困難な場合が多く、それらに関する知見は極めて少ない。

申請者の所属していた研究室では、近年、*Plasmodium falciparum* の生体内メチル化に関与する酵素である S-アデノシル-L-ホモシステイン加水分解酵素 (*PfSAHH*) に関する構造機能相関研究を進めている (岐阜大学・工学部・北出幸夫教授らとの共同研究)。同研究において、*PfSAHH* の大量発現、結晶化、反応生成物複合体の X 線結晶構造解析に成功した。しかし、*PfSAHH* はヒトにも存在する酵素であり、その阻害剤を抗マラリア薬として応用するためには阻害効果の厳密な種選択性が求められる。従って、基礎研究としては興味深いテーマであるが、実用化には困難が予想される。一方、ヒトに存在しない代謝経路である非メバロン酸経路は抗マラリア薬の有望な標的である。そこで、上記の研究により培ってきたマラリア原虫由来組換えタンパク質の取扱い技術を十分に活用できる本申請を計画した。

2. 研究の目的

熱帯熱マラリア原虫の生育に必須の代謝経路である非メバロン酸経路に注目した。非メバロン酸経路は、真正細菌やマラリア原虫に特徴的に存在する代謝経路であるため、新規抗生物質の標的として注目されている。同経路に関する研究は、抗生物質開発の標的として国内外で精力的に進められている。特に、組換え体の調製が容易な大腸菌や好熱菌に関しては、非メバロン酸経路中全ての酵素の結晶構造が報告されている。一方、マラリア原虫の非メバロン酸経路に関しては、構造生物学的研究は皆無であった。大腸菌や好熱菌由来酵素とマラリア原虫由来該当酵素との間にはアミノ酸配列の顕著な差異や挿入欠失等があるため、前者の立体構造を用いたマラリア原虫由来酵素の阻害剤デザインの信頼性は低く、原虫由来酵素の立体構造が必須である。非メバロン酸経路の阻害は、マラリア原虫に対して致死的效果を与えるが、同経路を持たないヒトには毒性を示さないことが予想されるため、抗マラリア薬の格好の標的である。

中でも同経路2段階目の反応を触媒する酵素 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (*PfDXR*) に注目し、本酵素に対する阻害剤のスクリーニング系の構築、また、

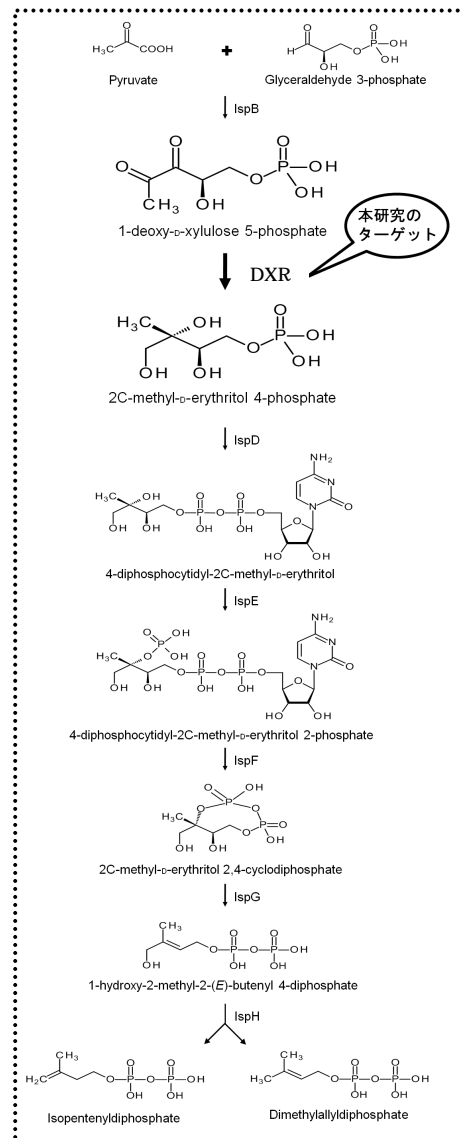


図1: 非メバロン酸経路と関連酵素

新規阻害剤との複合体の立体構造解析により阻害剤構造の最適化を目指した。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌を用いた発現系により *PfDXR* を大量発現させた後、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製。

(2) *PfDXR*/Mg(または Mn)/NADPH/阻害剤から成る4成分複合体の結晶化実験を行い、結晶が得られたものについて X 線回折実験を行い、得られた回折データから立体構造を明らかにする。

(3) 得られた結合様式を利用し、新規阻害剤の *in silico* デザインを行い、研究協力者により合成。

(4) 上記のサイクルを繰り返し、構造の最適化を目指す。

上記とは別に、精製済み *PfDXR* を用い、補酵素 NADPH の 340nm における吸収を利用し

た測定系を立ち上げ、新規阻害剤の活性測定を行う。また、Biacore を用いた新規化合物との結合強度測定を行い、阻害能を評価する。

4. 研究成果

熱帯熱マラリア原虫非メバロン酸経路第二酵素 *Pf*DXR の立体構造解析に取り組み、新規阻害剤存在下の 4 成分 (*Pf*DXR/Mg/NADPH/inhibitor) 複合体の立体構造解析に成功した。用いた新規阻害剤は、既存阻害剤である fosmidomycin の誘導體であり、fosmidomycin に比べより強力な *Pf*DXR 阻害能を有する化合物である。研究協力者であるドイツのハインリヒ・ハイネ大学デュッセルドルフの Thomas Kurz 教授らのグループより、十数種類の新規化合物を提供して頂き、結晶化条件のスクリーニングを行い、結晶が得られたものについて回折強度データの収集を行った。提供された化合物中、10 種類以上に関し *Pf*DXR との複合体の微小結晶を得ることに成功した。その内、3 種類に関し十分な分解能の回折強度データが得られた

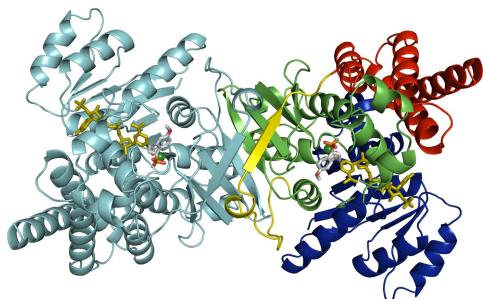


図2: 4成分 (*Pf*DXR/Mg/NADPH/inhibitor) 複合体の立体構造

回折データの解析により、複合体の立体構造解析に成功し、その結果、新規化合物中に新たに導入された官能基と *Pf*DXR との相互作用は、これまでに明らかにされている *Pf*DXR と fosmidomycin との間見られた相互作用とは異なる新たな相互作用様式であった。*Pf*DXR に対して fosmidomycin よりも阻害能が良いことは、この相互作用様式の違いによるものだと考えられる。特に、新規化合物の大きな置換基を収容するため、Trp296 を含むループ領域の構造変化が見られた。

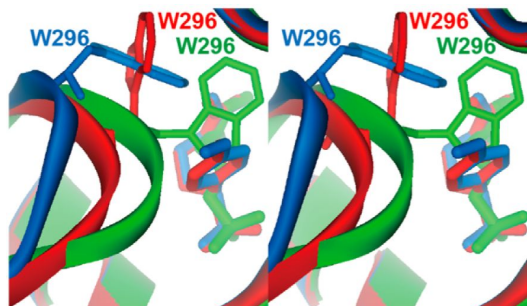


図3: Trp296 を含むループ領域の構造変化

Biacore を用いた *Pf*DXR に対する阻害剤のスクリーニング系については、まず、*Pf*DXR をリガンドとして固定化し、アナライトとして既知の阻害剤である fosmidomycin を用いて行ったが、有意な結果を得ることは出来なかった。その後、ランニング緩衝液の組成、*Pf*DXR および阻害剤の濃度など、条件を変え試してきたが、有意な結果を得ることは出来なかった。

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 3 件)

Konzuch, S., Umeda, T., Held, J., Hähn, A., Brücher, K., Lienau, C., Behrendt, C., Gräwert, T., Bacher, A., Illarionov, B., Fischer, M., Mordmüller, B., Tanaka, N., & Kurz, T. Binding modes of reverse fosmidomycin analogs towards the antimalarial target IspC. *J. Med. Chem.* **57**, 8827-8838. (2014)
DOI: 10.1021/jm500850y
査読有り

田中信忠、梅田知伸、日下部吉男、中西雅之、北出幸夫、中村和郎
抗マラリア薬の開発を指向した構造生物学的研究
薬学雑誌 **133**, 527-537 (2013)
DOI:10.1248/yakushi.13-00001-3
査読有り

梅田知伸、日下部吉男、田中信忠
抗マラリア薬の開発を指向した熱帯熱マラリア原虫由来ホスミドマイシン標的酵素の結晶構造解析
日本結晶学会誌 **54**, 107-112 (2012)
DOI :10.5940/jcrsj.54.107
査読有り

(学会発表) (計 2 件)

梅田知伸
Crystal structures of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) from *Plasmodium falciparum* complexed with inhibitors.
アジア結晶学会 2012年 12/2 ~ 12/5
アデレード(オーストラリア)

梅田知伸
熱帯熱マラリア原虫由来酵素の発現系の改良と結晶化
日本薬学会第 134 年会 2014 年 3/27 ~ 3/30
熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅田 知伸(UMEDA, Tomonobu)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号:80514471

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: