

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01951

研究課題名（和文）抗原虫活性物質の結合タンパク質同定と新規創薬ターゲットの開拓

研究課題名（英文）Identification of the anti-protozoal compound binding protein for the development of novel drug targets.

研究代表者

石山 亜紀 (Ishiyama, Aki)

北里大学・感染制御科学府・特任助教

研究者番号：70300746

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）：チロシンキナーゼ阻害剤であるnilotinibは抗マalaria活性を示す。しかしながらマalaria原虫にはチロシンキナーゼが存在せず、新たな作用機序(MOA)が示唆される。これを解明するためtarget protein fishingを適応しnilotinib結合タンパク質を得た。結合タンパク質の一部はEndoplasmic reticulum chaperone homolog, RNA helicase(pfelF4A)、膜タンパク質Aと同定した。pfelF4Aは必須因子であり(PlasmoDBより)、新たな創薬ターゲットの開拓に繋がる可能性が得られた。タンパク質発現およびnilotinib耐性マalaria原虫の作製による検証を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nilotinibの結合タンパク質の1つとして得られたpfelF4Aは原虫にとって必須因子であり、新たな創薬ターゲットが見出されたと言える。機能未知な膜タンパク質Aは創薬標的分子として応用が可能か、あるいはマalaria原虫の生物学的研究および診断薬などへの応用が可能であることを検証することに意義がある。現在使用されている抗原虫剤の多くは作用標的が未解明なものが多く今後の進展が期待される。本研究で得られた結果は輸入感染症対策、新興再興感染症対策に繋がり、また人類の健康に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）： We reported tyrosine kinase inhibitor nilotinib showed antimalarial activity both in vitro and in vivo. However, it is clear that Plasmodium does not have tyrosine kinase, indicate presence of novel mode of action (MOA). To identify the antimalarial MOA of nilotinib, target protein fishing was used for obtaining binding proteins. Five binding proteins were obtained and a part of them were identified endoplasmic reticulum chaperone homolog, RNA helicase (pfelF4A) and a membrane protein A. PfelF4A is an indispensable factor for malaria parasite (from PlasmoDB) and it might be lead to development for new target.

Protein expression of pfelF4A and creating of nilotinib resistant P.falciparum are ongoing to validate the MOA.

研究分野：寄生虫学

キーワード：target protein fishing マalaria原虫 リーシュマニア原虫 トリパノソーマ原虫 抗原虫活性物質
ゲミカルバイオロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアおよびNeglected Tropical Diseasesであるトリパノソーマ症、リーシュマニア症は、熱帯、亜熱帯地域を中心に蔓延する原虫感染症である。既存薬に対する耐性原虫の蔓延と出現、副作用といった問題があり、新たな骨格、作用メカニズムを持つ治療薬が常に求められている。

研究代表者の所属研究室では今までに創薬シードとして既存薬とは異なるユニークな骨格を持つ抗原虫活性物質を多数見出しているが、見出された化合物の抗原虫作用標的については未解明のままである。

研究代表者は抗マラリア剤の探索研究の過程で慢性骨髄性白血病の治療薬として用いられているBcr-Abl チロシンキナーゼ阻害薬 nilotinib の抗マラリア活性を見出した。しかしながら、マラリア原虫kinomeにはチロシンキナーゼが存在しない。そこで、マラリア原虫内にnilotinibの新規分子標的が存在すると考え、ケミカルバイオロジーの手法であるtarget protein fishingを適応し標的タンパク質の解明およびMOAの検討に着手した。

2. 研究の目的

(1) 抗原虫活性物質とそれぞれの起原虫(マラリア原虫、トリパノソーマ科原虫:トリパノソーマ原虫、リーシュマニア原虫)ライゼートを用いたtarget protein fishingにより、抗原虫作用標的タンパク質を同定、検証することで新たな創薬ターゲットを開拓する。

(2) (1)で得られた成果を寄生虫感染症に対する創薬研究にフィードバックし、さらなる研究の推進を目指す。

3. 研究の方法

(1) Nilotinib 結合タンパクの同定(先行実験の継続)ではマラリア原虫の大量培養を行いマラリア原虫の細胞質および核タンパク質フラクションを調製しtarget protein fishing(図-1)に用いた。得られた結合タンパクは SDS-PAGE により展開後、染色、切り出しを行い、peptide mass finger printing (PMF)や LC-MS/MS にて解析し、結合タンパク質を

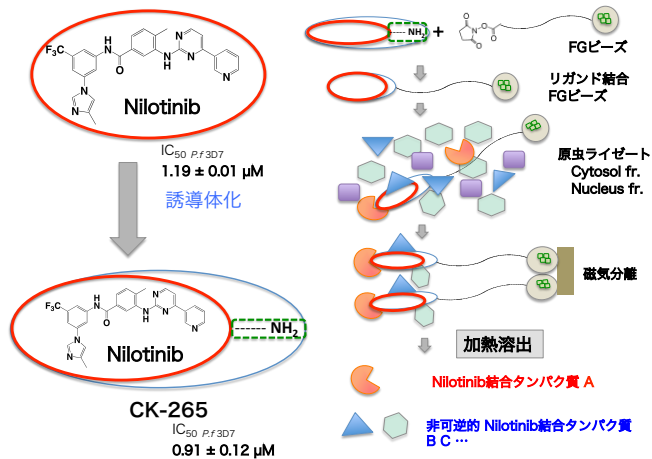


図-1 Target protein fishing

同定した。標的タンパク質候補の検証をするため結合タンパク質のクローニング^{1,2)}を行い、タンパク発現を行った。また、nilotinib 耐性原虫の作製を行った³⁾。

4. 研究成果

(1) Nilotinib結合タンパク質を同定するためにマラリア原虫の大量培養を行い原虫ライゼート(細胞質フラクション、核フラクション)の調整を行った。リガンド結合ビーズを用い、細胞質フラクションを用いたtarget protein fishingの検討ではSDS-PAGE上で3-5本程度の結合タンパク質が確認された。数回の検討を実施し、リガンド結合量が0 mMのレーンにバンドが確認されず、リガンド結合量が0.1, 0.2 mMと増加するに従い濃くなるバンドを指標に、SDS-PAGEゲルより5本の結合タンパク質バンド(図-2, 左)を切り出した。この中で現性の高いバンド3本についてLC-MS/MS解析を行い、結合タンパク質として、2: Endoplasmic homolog、4: RNA helicase (pfeIF4A)、5: 膜タンパク質Aが同定された。他の結合タンパク質も順次解析を行っていく。

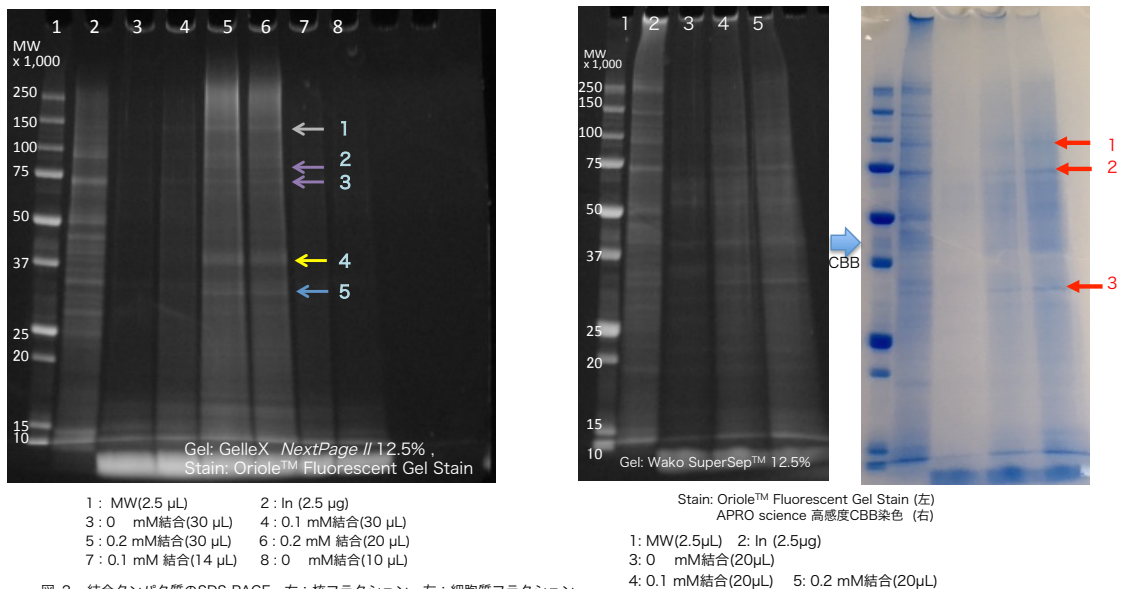


図 2 結合タンパク質のSDS-PAGE 右:核フラクション 左:細胞質フラクション

核フラクションを用いて同様に検討を行ったところ、SDS-PAGE上で3本の結合タンパク質バンドが確認された(図-2,右)。このうちの一つ(3)を解析した結果、細胞質フラクションで確認された5:膜タンパク質Aと同じであった。こちらも未同定の結合タンパク質について順次解析を試みる。

*pfeIF4A*はマラリア原虫の生存にとって必須であることから⁴⁾ 新たな創薬ターゲット開拓に繋がる可能性が得られた。Nilotinibが*pfeIF4A*の阻害剤として作用するかを検証するためクローニングを行い、pET systemでタンパク発現を検討した。構築したプラスミドをBL21 (DE3)、Rosetta (DE3) pLySs、BL21 (DE3) pLySsにトランスフェクションし培養を行ったが、いずれの大腸菌でもIPTG添加により顕著に増大するバンドはみられていない。一部精製による確認、培養条件の見直し、コドン最適化²⁾などの方法を検討する。また、*pfeIF4A*阻害剤としてnilotinibを評価するため、系の構築も進める予定である。その他同定された結合タンパク質を含め、検証を進めるためにnilotinib耐性マラリア原虫の作製を継続しているが、未だ耐性化は見られていない。

(2)リーシュマニア原虫を用いたtarget protein fishing の最適化に向けて原虫ライゼートを得るために大量培養の検討を開始した。リーシュマニア原虫はマクロファージ等の宿主細胞に対して十分な感染力を維持したリーシュマニア原虫が得られているが、ホストマウスから得られるamastigoteの量、*in vitro*培養での維持、細胞増殖度が一定しないためtarget protein fishingに使用する原虫ライゼートを調整するまでの安定した原虫量確保には至っていない。

<引用文献>

- ① J. Mol. Biol. (2007) 373, 268-281.
- ② Protein Expression and Purification(2012) 85, 1-8.
- ③ ACS Infect. Dis. (2016) 2, 816-826.
- ④ PlasmoDB. (2019) Release 46, 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石山亜紀, 岩月正人, 穂苅玲, 清水優希, 朝光優子, 宇野佑子, 澤匡明, 乙黒一彦, 大村智
2. 発表標題 抗原虫活性物質の結合タンパク質同定と新規創薬ターゲットの開拓: 抗マラリア活性物質Nilotinibの作用機序に関する研究
3. 学会等名 第60回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2019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	穂苅 玲 (Hokari Rei)		
連携研究者	岩月 正人 (Iwatsuki Masato) (70353464)	北里大学・感染制御科学府・准教授 (32607)	
連携研究者	松本 厚子 (Matsumoto Atsuko) (20300759)	北里大学・感染制御科学府・准教授 (32607)	
連携研究者	野中 健一 (Nonaka Kenichi) (60421369)	北里大学・感染制御科学府・助教 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	廣瀬 友靖 (Hirose Tomoyasu) (00370156)	北里大学・感染制御科学府・准教授 (32607)	