

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253025

研究課題名(和文) 薬剤分子標的シアン耐性酸化酵素のケミカルバイオロジー

研究課題名(英文) Chemical biology of cyanide-insensitive Trypanosome alternative oxidase.

研究代表者

北 潔 (KITA, Kiyoshi)

長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・教授

研究者番号：90134444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は寄生虫のエネルギー代謝系酵素群が極めて特殊な性質を持ち、宿主中での寄生適応に重要な役割を果たしている事を明らかにして来た。シアン耐性酸化酵素(Trypanosome alternative oxidase)は宿主の血流中に生息するアフリカトリパノソーマの増殖に必要不可欠であり、薬剤標的として有望な酵素である。

そこで我々が見出した特異的阻害剤アスコフラノンに着目し、化学の領域から生命現象を捉え、その応用を視野に入れたケミカルバイオロジーの観点により酵素の特徴、阻害剤との相互作用、そしてアスコフラノンの生合成経路を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We have shown the parasite energy metabolism enzymes has extremely special properties and plays an important role in adaptation in the host. Trypanosome alternative oxidase is essential for the growth of African trypanosome inhabiting the host's bloodstream and is a promising enzyme as a drug target.

We focused on the specific inhibitor ascofuranone which we discovered. Characteristics of the enzyme, its interaction with inhibitors and biosynthesis of ascofuranone have been studied from a standpoint of chemical biology which includes chemical approaches as well as general biology and keeps mind application.

研究分野：寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：シアン耐性酸化酵素 トリパノソーマ アスコフラノン 生合成

1. 研究開始当初の背景

寄生虫は真核生物における適応現象の研究を進めるうえで極めて良い研究対象であり、特にエネルギー転換系の様な全生物に共通の代謝系の適応や進化、また基本的な反応機構を理解するうえで最適な系のひとつと考えられる。我々はこの様な観点から、回虫やトリパノソーマ、マラリア原虫などの寄生虫とその宿主であるヒトのエネルギー代謝に関し「寄生適応機構の解明」を目的として研究を進めている。その結果、寄生虫ミトコンドリアにおいて多様な呼吸鎖が機能し、細胞質の酵素と協同しつつ環境の変化に対応している事が判って来た。中でも最近アフリカトリパノソーマのエネルギー代謝関連酵素群が極めて特殊な性質を持ち、宿主中でのエネルギー代謝に重要な役割を果たしている事が明らかになった。そこで研究ではこれらの酵素のうち、細胞内レドックス調節に必須な寄生適応代謝の鍵酵素である「シアン耐性酸化酵素 (Trypanosome alternative oxidase : TAO)」とその特異的阻害剤で抗トリパノソーマ薬として注目されているアスコフラノンに焦点を絞り、その酵素機能とアスコフラノンによる阻害機構をケミカルバイオロジーの面から明らかにする事を目的として研究を進める事とした。

(1) *Trypanosoma brucei* TAO の分子構築と酵素反応機構

宿主哺乳類に寄生する *T. brucei* の血流型のエネルギー代謝は主に解糖系に依存し、これはグリコソームと呼ばれるオルガネラ内で進行する。ここでミトコンドリアはATP合成に直接関与しないが、その特殊な呼吸系は原虫の増殖に不可欠である。すなわち解糖を常に進行させるためにはNADHの再酸化が必要であり、これにミトコンドリアの呼吸が関わっている(図1)。この系の末端酸化酵素であるTAOは、ベクターであるツェツェバエ中の昆虫型原虫のミトコンドリアに存在する哺乳類型のシアン感受性のシトクロムc酸化酵素(複合体IV)とは全く異なる酵素であり、還元型ユビキノン(ユビキノール)を酸素分子を用いて直接酸化する。

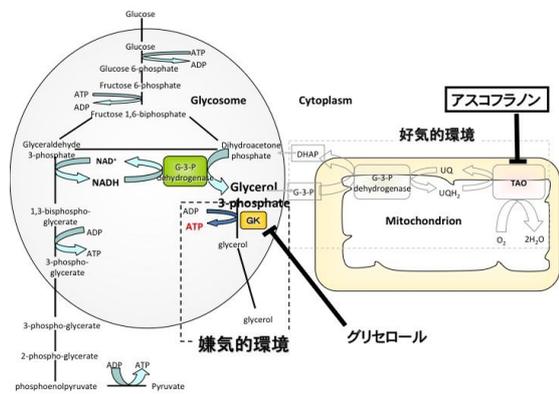


図1. 血流型 *T. brucei* のエネルギー代謝

TAOは分子量約36 kDaの単一ペプチドでプロトンポンプ活性を持たず、酸化酵素活性はシアン耐性である。本酵素はトリパノソーマばかりでなく高等植物、藻類、真菌類などのミトコンドリアにも存在し、Alternative Oxidase (AOX)と呼ばれている。AOXの研究においてこれまでの最大の問題は酵素が不安定であり精製が困難なため生化学的、物理化学的解析が遅れている点であった。そこで我々はTAOの大腸菌での発現系を確立し、その細胞膜から高活性、高純度の精製標品を得る事ができた¹⁾。

以上の結果は多くの生物種のAOXのなかで、高いキノール酸化酵素活性をもったはじめての精製例であり、その後補欠分子族の分析、酵素学的な解析が進み、さらにAOXではじめての結晶も得る事ができた²⁾。

もう一点重要な事は我々が、TAOをIC₅₀が0.13 nMと言う極めて低濃度で特異的に阻害するアスコフラノンを見出している事実である。アスコフラノンは糸状菌が産生する低分子化合物であり、これまでの我々の研究から、培養における原虫のみならず、*T. brucei*を感染させたマウスや*T. vivax*感染により瀕死のヤギを一夜で完治させる事が示され、新規抗トリパノソーマ薬として内外から大きな期待が寄せられている³⁾。

(2) TAOの特異的阻害剤アスコフラノンのケミカルバイオロジー

TAOの特異的阻害剤であるアスコフラノンは1968年に東京大学農学部の田村学造教授らによって、糸状菌 *Ascochita viciae* が産生する抗ウイルスおよび抗がん作用を持つ

フェノール化合物として見出された。その後、研究代表者らが TAO を nM オーダーで特異的に阻害する事を見出し、さらに 200 以上の誘導体を合成してその構造活性相関について解析を進め、その強力な阻害作用にフェノール骨格とその全ての側鎖が重要な役割を果たしている事を明らかにした⁴⁾。

2. 研究の目的

本研究では「1. 研究開始当初の背景」で述べたこれまでの成果を踏まえ、TAO の特殊な反応機構を、その立体構造解析から原子レベルで明確にし、さらに生理機能を明らかにするとともに、特異的阻害剤アスコフラノンの阻害機構および生合成経路の解明に基づいた薬剤開発戦略の確立を目的としている。

さらにアスコフラノンの全生合成経路を明らかにし、中間代謝物を起点とするアスコフラノン誘導体半合成系を確立し、抗トリパノソーマ薬実用化への具体的な戦略を構築する事を目的としている。

3. 研究の方法

(1) *T. brucei* TAO の分子構築と生理機能

T. brucei TAO の結晶解析

連携研究者である京都工芸繊維大学の原田繁春教授との立体構造解析の結果とやはり連携研究者の鳥取大学の齋本博之教授の合成した 200 種の誘導体を用いた構造活性相関の結果⁴⁾の総合的解析から、ユビキノンの結合部位とアスコフラノンの強力な阻害に重要な役割を果たしている TAO のアミノ酸残基を特定した。

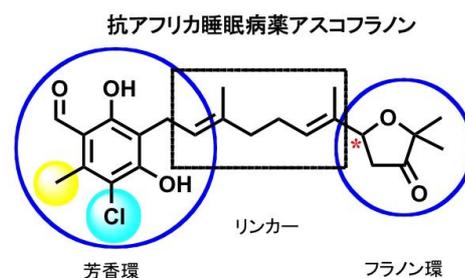
アスコフラノン誘導体の培養系およびマウスを用いた薬効評価

我々はこれまでの研究ですでにアスコフラノンにより通常動物実験で用いられている *T. b. brucei* のみならずヒトに感染して眠り病を発症する *T. b. rhodesiense* 感染マウスが完治する事を示して来たが⁶⁾、その劇的な効果にはアスコフラノン投与時に代償的に誘導されて ATP 合成を行うグリセロールキナーゼ (GK) を阻害するグリセロールの併用、あるいは数日間の連続投与が必要であった。そこでこの点を改善する目的で新たに合成した誘導体を用い、培養系およびマウスの感染系で薬効を評価した。

(2) アスコフラノン生合成経路の解明

TAO の特異的阻害剤であるアスコフラノンは 1972 年の報告以来、日本の製薬企業で抗

がん剤として開発が試みられ、一時は大量産生株の発酵によって kg オーダーの生産も行われていたが、期待した効果が得られず開発は中止された。開発中止とともに生合成経路も含め研究は中断していたが、我々はアスコフラノンが TAO を特異的にしかも極めて低濃度で阻害する事を見出した⁵⁾。アスコフラノンは図 2 に示す様に芳香環、リンカー、フラノン環の 3 つの部分から構成されている。



標的: シアン耐性酸化酵素 (TAO)

IC₅₀: 0.13 nM

田村学造教授 (東大・農・農芸化学科) により 1972 年に発見

図 2. アスコフラノンの構造

我々の研究から、酵素に対する阻害には芳香環部分が必須であり、また分子に疎水性を付与するリンカーの至適な長さが明確になっている⁴⁾。培養系までは mg オーダーの合成で十分に実験可能であるが、動物を用いた感染治療実験には少なくとも g オーダーの化合物が必要であり、しかもこれまで見出した高い効果を示す誘導体はアスコフラノンも含め環境汚染等の問題から kg オーダーの工業的 GMP レベルでの合成が不可能なものがほとんどである。

大村智教授によって見出された抗糸状虫薬アイバメクチンの例でも判る様に、微生物の産生する薬剤の場合、その生合成経路の解明は実用化ばかりでなく、天然物化学や構造活性相関の面でも非常に貴重な情報源となる。そこで現在まで維持して来た *A. viciae* およびアスコフラノンの産生が報告されている *Acremonium sclerotigenum* など他の糸状菌を用い、その全生合成経路を明らかにし、アスコフラノンの大量生成とその中間体を出発材料として、感染動物に高い効果を示し、より低コストで高純度の誘導体の大量合成をめざした。そこで *A. viciae* および *A. sclerotigenum* を可能な限り収集し、その培養系において培地組成、温度、通気、pH、培養時間、その他サプリメントなどを変える事

により、アスコフラノン的大量に合成する条件を見出した。さらに生産量の大きく異なる培養で発現している遺伝子群の比較からアスコフラノン生合成系の遺伝子群を同定し、大量調製の基盤を確立した。

4. 研究成果

(1) *T. brucei* TAOの分子構築と生理機能

T. brucei TAOの結晶解析

これまでにアスコフラノン誘導体であるAF27790Hとの共結晶は得られていたが、アスコフラノンとの共結晶は得られていなかった。そこで種々の条件でTAO-AFの共結晶条件を探索した結果、良質な結晶を得る事ができた。このTAO-AF複合体の結晶から得られたデータを解析した結果、以下の点が明らかになった。

TAOは、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果から予想されるように、結晶中でもダイマー構造を形成していた。ダイマー形成にはN末端のループ領域が重要な役割を果たし、一方のサブユニットのN末端領域がもう一方のサブユニットへ肩を組み合うように伸びて強固なダイマーが形成されていた。TAOモノマーは、6本の長いヘリックス(1~6)と4本の短いヘリックス(S1~S4)で構成されていた。4本のヘリックス(2、3、

5、6)が束になってできたバンドル構造中、TAOのアミノ酸配列に存在する二核鉄結合モチーフが二核鉄に配位して活性部位を形成していた。1と4の表面には疎水性アミノ酸残基の側鎖が集まった大きな領域があり、その周りに脂質二重膜のリン酸基と静電的相互作用できるように塩基性アミノ酸残基がとり囲んでいた。X線解析の結果はAnderson & Nordlund等が予測した膜結合型モデルを支持しているが、ヘリックスの配置やダイマーで存在している事は予想とは全く異なっていた。

またアスコフラノンは二核鉄近傍の1と4の間にある疎水性ポケットに結合していた(図3)。芳香環は、主に疎水性アミノ酸残基(Leu122、Leu212、Ala216、Tyr220)に囲まれ、2位の水酸基にはArg118とThr219が水素結合していた。また、イソプレン単位から成るtail領域は1'位で約90度折れ曲がり、疎水性ポケットの周辺のアミノ酸残基Cys95、Arg96やGlu215と相互作用していた。さらに、

アスコフラノンと相互作用しているアミノ酸残基は、Cys95を除いてほとんどすべてのシアン耐性キノール酸化酵素で保存されていた。

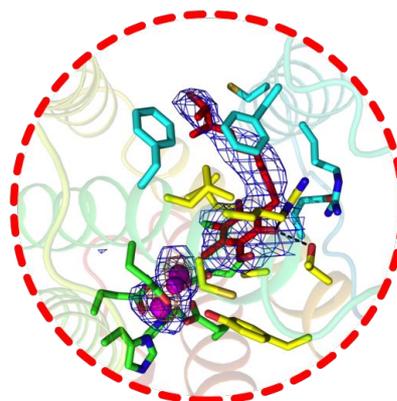


図3.アスコフラノンのTAOへの結合

アスコフラノン誘導体の培養系およびマウスを用いた薬効評価

培養原虫の増殖阻害における構造活性相関を検討したところ、培養原虫の増殖阻害には、これまで組換えTAOの活性阻害には重要とされていなかったアスコフラノン誘導体の側鎖末端構造が関わっている事が明らかとなった。例えば、501-16-Gと502-16-Gの二つの化合物を比較すると、側鎖末端の構造が酸素原子もしくはメチル基か以外は、芳香環の官能基、リンカーの構造長さともに同じであり、かつ組換えTAOに対する IC_{50} 値もそれぞれ0.32 nM、0.3 nMとほぼ同じにも関わらず、培養原虫に対する GI_{50} 値には400倍以上の差があった。この事から、培養原虫に対する増殖阻害には側鎖末端の構造が大きく影響を及ぼす事が予想された。さらに、阻害効果が極めて強力で0.5 pMの濃度においても50%以上の増殖が認められず、培養原虫に対する GI_{50} 値が決定できなかった誘導体、234-12-OPiv、235-12-OPiv等を見出した。それら誘導体に共通して見られた構造は、側鎖末端にpivaloylグループを持つ事であった。したがって、アスコフラノンの培養原虫に対する増殖阻害効果はpivaloyl groupによって増強する事ができると考えられる。

次にアスコフラノンおよび酵素、培養原虫に対して IC_{50} 値、 GI_{50} 値が数nM以下と強力な阻害効果を示し、かつ化学合成がアスコフラノンより容易であり、さらにマウスを用いた感染治療実験に必要量を入手できた誘導体

236-12-0Propynyl、234-12-0Piv、280-12 の3種類に関して、*T. b. brucei* 感染マウスにおける治療効果を検討した。その結果、陽性対照のアスコフラノンに加え、アスコフラノン誘導体 236-12-0Propynyl、234-12-0Piv、280-12 すべてがグリセロールの併用によりマウスを完治させた。

(2) アスコフラノン生合成経路の解明

我々が維持して来たアスコフラノン産生菌である田村株は *Ascochyta viciae* と分類されていたが、*A. viciae* の分子情報はなく系統学的位置や近縁菌株の有無が不明であった。そこで、リボソーム DNA 配列を決定したところ、田村株は *Acremonium sclerotigenum* の配列と完全に一致した。アスコフラノンやその類縁体であるアスコクロリンの産生が報告されている糸状菌は全て *Acremonium* 属と比較的近縁であることから、アスコフラノンの産生はそれらが有する特徴であると考えられた⁷⁾。田村株の系統学的位置が特定されたので、田村株と国内外の株保存機関より取り寄せた *A. sclerotigenum* IF08385、IF05706 のアスコフラノンとアスコクロリン産生量を HPLC により分析したところ、同一培養条件下でそれぞれの産生量は大きく異なった。

そこで次にアスコフラノンの生合成経路の解明を目的として、*A. sclerotigenum* をアスコフラノン高産生培養条件と低産生培養条件の二つの条件下で培養を行い、両者の遺伝子発現解析を行った。その中で見出したアスコフラノン生合成遺伝子クラスターと思われる領域に存在する遺伝子が、真の生合成遺伝子である事を実証するため、プロトプラストポリエチレングリコール法によってニホンコウジカビにこれらの遺伝子を順次導入し、アスコフラノンの生合成経路を一段階ずつ検討した。その結果、高産生培養条件下において低産生培養条件下と比較して、2 遺伝子以上が連続して 300 倍以上の倍率で高発現している遺伝子が集中している唯一の領域を見出す事ができた(図4)。その領域には、ポリケチドシンターゼやプレニルトランスフェラーゼ、ハロゲナーゼなど、アスコフラノン生合成に関与していると推定される 8 つの遺伝子 (*ascA*-*ascH*) が存在していた。また、ニホンコウジカビを用いた遺伝子の異種発現実験によって、*ascB*、*ascC*、*ascD*、*ascE*

の4つの遺伝子の機能を明らかにする事ができた。アセチル CoA を出発物質とし *AscD* の作用によって産生されるオルセリン酸、*AscB* がオルセリン酸に作用して産生される *Illicicolinic acid B*、続いて *AscC* が *Illicicolinic acid B* に作用して産生される LL-z1272β、さらに *AscE* が LL-z1272β に作用して、アスコフラノンの前駆体であると考えられる *Illicicolin A* が産生される事が明らかとなった。

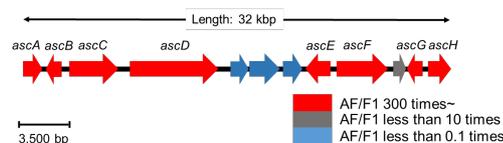


図4. アスコフラノン高産生培養条件下において高発現している遺伝子領域

(3) まとめと考察

本研究における立体構造解析より、抗トリパノソーマ薬候補アスコフラノンとその標的である TAO の結合についての原子レベルでの詳細な情報が得られ、これに基づいた構造活性相関の結果から感染マウスを完治させる完全合成誘導体を4化合物見出す事ができた。

さらにこれまで維持して来たアスコフラノン産生菌が *Acremonium sclerotigenum* である事が明らかになり、アスコフラノン生合成に関わる遺伝子クラスターを見出した。そしてアセチル CoA を出発物質としアスコフラノンの前駆体であると考えられる *Illicicolin A* が産生される事を明確にした。

以上の成果はアスコフラノンをヒトの眠り病、家畜のナガナ病の治療薬としてばかりでなく、アスコフラノンの有する様々な生理活性を標的する薬剤の開発を大きく進展させるものであり、「自然からの恵み」を人々や動物の健康と福祉に生かして行く極めて優れた例と考えられる。

<引用文献>

- 1) Kido, Y. *et al.*, (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, 1797, 443-450
- 2) Shiba, T. *et al.*, (2013) *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA 110, 4580-4585
- 3) Moore, A. *et al.*, (2013) Ann. Rev. Plant Biol. 64, 637-663
 - 4) Saimoto, H. *et al.*, (2013) J. Biochem. 153, 267-273
 - 5) Minagawa, N. *et al.*, (1996) Mol. Biochem. Parasitol. 81, 127-136
 - 6) Yabu, Y. *et al.*, (2003) Parasitol. Int. 52, 155-164
 - 7) Hijikawa, Y. *et al.*, J. Antibiotics, in press

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 12 件)

Inaoka, D. K., Harada, S., Kita, K., Inoue, M. *et al.* (他 8 名 11 番目)、Design and synthesis of potent substrate-based inhibitors of the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase. Bioorg. Med. Chem., 査読有、25(4)、2017、1465-1470
doi: 10.1016/j.bmc.2017.01.009

Inaoka, D. K., Kita, K., Harada, S. *et al.* (他 18 名 20 番目)、The Open Form Inducer Approach for Structure-Based Drug Design. PloS one, 査読有、11(11)、2016、e0167078
doi: 10.1371/journal.pone.0167078

Goodman, C. D., Kita, K., McFadden, G. I. *et al.* (他 11 名 12 番目)、Parasites resistant to the antimalarial atovaquone fail to transmit by mosquitoes. Science, 査読有、352(6283)、2016、349-353
doi: 10.1126/science.aad9279

Yoshino, R., Inaoka, D. K., Harada, S., Kita, K., Sekijima, M. *et al.* (他 10 名 14 番目)、Pharmacophore Modeling for Anti-Chagas Drug Design Using the Fragment Molecular Orbital Method. Plos one, 査読有、10(5)、2015、e0125829
doi: 10.1371/journal.pone.0125829

[学会発表](計 26 件)

Kiyoshi Kita, Diversity of respiratory chains in parasite mitochondria - As a drug target -, the 115th International Titisee Conference, 2017.3.29-2017.4.2, Mainz (Germany)
北 潔, NTDs と治療薬の現状と課題、日本薬学会第 137 年会、2017.3.25、仙台国際センター(宮城県、仙台市)

Kiyoshi Kita, Ascofuranone: a gift from nature as anti-parasite drug, US-Japan EID Meeting-50th Anniversary, 2016.1.11-2016.1.12, Bethesda(USA)

[図書](計 2 件)

Nihashi, N., Inaoka, D. K., Kita, K.

et al. (他 11 名 11 番目)、Springer International Publishing, Kala Azar in South Asia, 2016、309(101-122)
Young, L., May, B., Shiba, T., Harada, S., Inaoka, D. K., Kita, K., Moore, A. L., Springer Netherlands, Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling, 2015、739(375-394)

[産業財産権]

出願状況(計 3 件)

名称: Endoparasite control agent

発明者: Kiyoshi Kita, Akiyuki

Suwa, Masatsugu Oda, Koji Tanaka

権利者: The University Of Tokyo,

Nihon Nohyaku Co., Ltd.

種類: 特許

番号: US20170037029 A1

出願年月日: 2016/10/20

国内外の別: 国外

名称: Endoparasite control agent and method for using the same

発明者: Kiyoshi Kita, Akiyuki

Suwa, Masatsugu Oda, Koji Tanaka

権利者: The University Of Tokyo,

Nihon Nohyaku Co., Ltd.

種類: 特許

番号: US20170014395 A1

出願年月日: 2016/9/15

国内外の別: 国外

名称: Dihydroorotic and acid

dehydrogenase inhibitor

発明者: Kiyoshi Kita, Daniel Ken Inaoka,

Hiroyuki Saimoto, Masaichi Yamamoto

権利者: Nai Inc.

種類: 特許

番号: US20160296494 A1

出願年月日: 2016/6/14

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北 潔 (KITA, Kiyoshi)

長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・教授

研究者番号: 90134444

(2) 研究分担者

稲岡 健ダニエル (INAOKA, Daniel Ken)

長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・助教

研究者番号: 10623803

(3) 連携研究者

原田 繁春 (HARADA, Shigeharu)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・教授
研究者番号: 80156504

齋本 博之 (SAIMOTO, Hiroyuki)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号: 20186977