

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32723

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19086

研究課題名(和文)新規抗マalaria薬の開発を志向した非メバロン酸経路酵素群の立体構造解析

研究課題名(英文)Structural Analysis of Non Mevalonate Pathway Enzyme Groups aiming at Development of Novel Antimalarial Drugs

研究代表者

梅田 知伸 (UEMDA, TOMONOBU)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80514471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗マalaria薬の開発に繋げるため、熱帯熱マalaria原虫由来非メバロン酸経路酵素群の立体構造を明らかにすることを目的とし、標的タンパク質の発現の構築、精製条件の検討、結晶化実験を行った。構造を明らかにするには至らなかったが、数種類の目的タンパク質について、大量精製することに成功し、結晶化条件のスクリーニングを行った。

研究成果の概要(英文)：To lead to the development of novel antimalarial drugs, we aimed to clarify the three-dimensional structure of the non-mevalonate pathway group derived from Plasmodium falciparum, establishing the expression of the target protein, examining the purification conditions, and conducting a crystallization experiment. Although it could not clarify the structure, we succeeded in large-scale purification for several target proteins and screened for crystallization conditions.

研究分野：構造生物学

キーワード：マalaria 非メバロン酸経路 X線結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

寄生原虫感染症であるマalaria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alaria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alaria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alaria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alaria原虫の中で、熱帯熱マalaria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alaria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。

申請者はこれまで、熱帯熱マalaria原虫由来非メバロン酸経路関連酵素である同経路2段階目の反応を触媒する酵素 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (PfDXR) について、新規阻害剤との複合体の立体構造解析に成功してきた。

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alaria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alaria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alaria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alaria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alaria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alaria原虫由来該当酵素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alaria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。

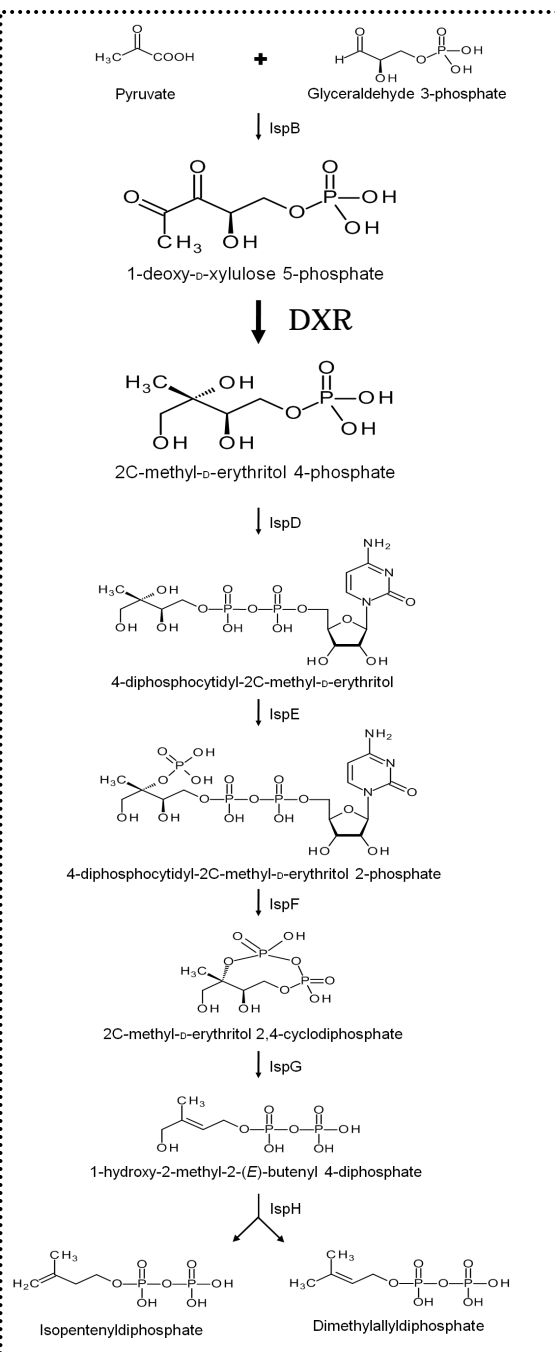
非メバロン酸経路の阻害は、マalaria原虫に対して致死的效果を与えるが、同経路を持たないヒトには毒性を示さないことが予想されるため、抗マalaria薬の格好の標的である。

本研究では、熱帯熱マalaria原虫由来非メバロン酸経路酵素群の網羅的な立体構造解析により、新規抗マalaria薬の開発に繋がる知見を得ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1)大腸菌を用いた目的タンパク質の大量発現系の構築。

(2)アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換



### 非メバロン酸経路と関連酵素

クロマトグラフィーなどにより、精製された目的タンパク質を大量に得るための最適な条件の検討。

(3)得られた目的タンパク質溶液を濃縮し、結晶化条件スクリーニングキットを用いて、結晶化条件の探索。

(4)結晶が得られたなら、X線回折実験を行い、回折データから立体構造を明らかにする。

### 4. 研究成果

熱帯熱マalaria原虫由来の非メバロン酸経路関連酵素群について、それらを標的とし

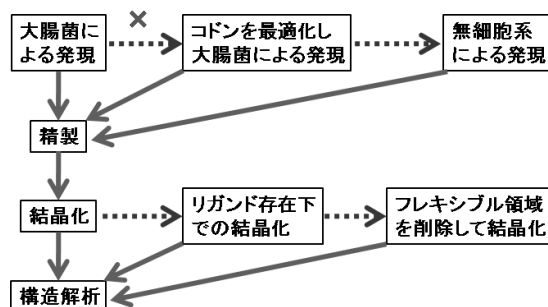
た新規抗マラリア薬の開発に繋がる知見を得ることを目的とし立体構造を明らかにすることを目指し、目的タンパク質の大量発現系の構築、培養・精製条件の検討、結晶化条件のスクリーニングを行った。

いくつかの目的タンパク質について、大腸菌を用いた大量発現系の構築、大量精製条件の確立に成功し、得られたタンパク質溶液を濃縮し、結晶化実験を行った。市販のスクリーニングキットを用いて、数百条件のスクリーニングを行ったが結晶を得ることは出来なかった。今後、発現させるタンパク質の領域を変えるなどして、発現系の構築、培養・精製条件の検討を行っていくことも考えられる。

全長では発現させることが出来なかったタンパク質について、発現させる領域を変え、発現ベクターを作製することで、大腸菌を用いて発現させることに成功した。今後、立体構造を明らかにすることを目指し、精製条件の検討、より多くの結晶化条件を試していきたい。

また、発現させることが出来ていないタンパク質群については、他のベクターの使用、大腸菌での発現用にコドンの最適化を行うなども試していきたい。それでも大腸菌での発現が難しいような場合には、無細胞系や、酵母の利用など、大腸菌以外の発現系の利用も考えていきたい。

また、酵素単体では結晶が得られない場合、補酵素や基質アナログなどとの複合体として結晶化実験を行うことも検討していく(下図参照)。



### 発現系構築および立体構造解析の困難対応

#### 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)

Katoh, S., Kobayashi, J., Umeda, T., Kobayashi, Y., Izumo, N., Suzuki, T.  
Chronic irradiation with low-dose-rate <sup>137</sup>Cs-γ rays inhibits NGF-induced neurite extension of PC12 cells via Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase

II activation.

*J Radiat Res.* **2017**, 58, 809-815.

DOI : 10.1093/jrr/rrx032

Katoh, S., Kobayashi, J., Umeda, T., Kobayashi, Y., Izumo, N., Suzuki, T.

Xray Irradiation Promotes Nerve Growth Factor-induced Neurite Extension in PC12 Cells.

*RADIOISOTOPES.* **2016**, 65, 137-143.

DOI : 10.3769/radioisotopes.65.137

Kusakabe, Y., Ishihara, M., Umeda, T., Kuroda, D., Nakanishi, M., Kitade, Y., Gouda, H., T. Nakamura, K., Tanaka, N.

Structural insights into the reaction mechanism of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase.

*Sci. Rep.* **2015**, 5, Article 16641.

DOI : 10.1038/srep16641

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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:

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)

横浜薬科大学・講師

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：

(4)研究協力者 ( )