

令和 2 年 6 月 5 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：17K08344

研究課題名(和文) NAD kinaseを標的とした赤痢アメーバ症治療薬シーズ天然化合物の探索

研究課題名(英文) Search for natural products which inhibit *Entamoeba histolytica* NAD kinase

研究代表者

森 美穂子 (Mori, Mihoko)

北里大学・感染制御科学府・助教

研究者番号：20425648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢アメーバ症は世界に蔓延する寄生虫症であり、日本国内でも近年患者が増加している指定感染症の一つである。新たな赤痢アメーバ症治療薬の開発を目指し、赤痢アメーバ特異的なNAD kinaseを標的とする酵素阻害化合物の探索を行った。日本産またはインドネシア産の放線菌および糸状菌の培養液約1,300サンプルを評価したが、目的の活性を示すサンプルは得られなかった。並行して同じサンプルの赤痢アメーバ原虫に対する殺虫活性を評価したところ、放線菌培養液からチャートルシンを、糸状菌培養液からテヌアゾン酸を活性化合物として新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において赤痢アメーバのNAD kinaseを阻害する微生物培養液を見出すことができなかった。評価法あるいは微生物培養液の調製法を見直す必要があると考えられた。並行して行った赤痢アメーバ原虫を用いた殺虫活性評価では複数の殺虫活性化合物が得られた。本研究において、赤痢アメーバ原虫の細胞選択的に毒性を示し、多くの種類の微生物が生産する化合物に関する知見を蓄積できた。今後の新規赤痢アメーバ症治療薬探索研究に活用されるよう本知見を論文として発表する。

研究成果の概要(英文)：Amebiasis is a diarrheal disease in human, caused by infection with the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Metronidazole has been a drug of choice against amebiasis for decades, however, this drug has several side effects and the resistant strain has been reported. Therefore, new drugs with different modes of action or targets have been needed. In this study, we established the screening system for inhibitors against *E. histolytica* NAD kinase. *E. histolytica* NAD kinase has the unique character and the essentiality of its gene has been confirmed. Although the screening for *Eh* NADK inhibitors was conducted using microbial broth extracts, no sample showed the inhibition. Concurrently we screened antiamebic samples using microbial broth extracts. We found chartreusin as an antiamebic compound with ED50 = 100 microM from a broth extract of one *Streptomyces* strain, and found tenuazonic acid as an antiamebic compound with ED50 = 50 microM from a broth extract of *Aspergillus nomius*.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：Entamoeba histolytica NAD kinase 微生物二次代謝産物 天然化合物 赤痢アメーバ アメーバ赤痢

1. 研究開始当初の背景

(1) 赤痢アメーバ症の現状

赤痢アメーバ症は、汚染された水や食物を摂取することでヒト体内に取り込まれた赤痢アメーバ原虫 (*Entamoeba histolytica*) が大腸で潰瘍を形成し、下痢、腹痛など赤痢に似た症状を示す寄生虫症である。さらに肝臓や肺、脳へ本原虫が移行して膿瘍を形成すると劇症化する。感染者は開発途上国を中心に全世界で 4,000 万人以上存在し、子供を中心に年間 7~10 万人が死亡していると推定されている。日本でも近年感染者数が増加していることから重要視され、5 類感染症として指定されている感染症の一つである。途上国とは異なり、日本では年間 1,000 例前後の感染例中、男性同性愛者間での性交渉による感染が多数を占めていることが特徴である。

赤痢アメーバはヒトの体内ではアメーバ状の「栄養型」で存在し、糞便とともに体外へ排出されるときは硬い外殻を持つ感染型の「嚢子 (シスト)」となる。現在、抗菌・抗原虫薬のメトロニダゾール (図 1 左) が治療に用いられているが、シストには効かず感染の拡大を抑制できないことに加え、耐性株の出現、高い催奇形性等の問題がある。近年日本でも承認されたアミノグリコシド系抗生物質パロモマイシン (図 1 右) はシストに効果を示すが、メトロニダゾールと同様の副作用が報告されている。そのため、これら既存薬とは異なる骨格・作用点を持ち、かつ安全な新規治療薬の開発が望まれている。

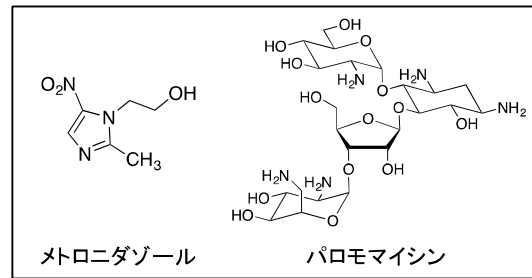


図 1. 既存の赤痢アメーバ症治療薬.

(2) 赤痢アメーバの NAD kinase はなぜ創薬標的として優れているか

上述の背景のもと、抗赤痢アメーバ症治療薬シーズ化合物を天然化合物から見出すことを目的に、赤痢アメーバの生存に必須なシステインの生合成を担い、かつ赤痢アメーバ特異的な 2 種類の酵素、セリン-アセチル転移酵素 (serine-acetyltransferase、SAT と略) とシステイン合成酵素 (cysteine synthase、CS と略) の阻害化合物を微生物二次代謝産物より探索した (基盤研究 C、H26-H28)。その結果、約 20 種の酵素阻害化合物を見出すことができた。しかし (1) いずれの化合物も赤痢アメーバ原虫に対し *in vitro* で抗原虫活性を示さなかったこと、(2) 標的としたシステイン生合成酵素の発現を抑制しても、外部からシステインを取り込める環境下では赤痢アメーバは死滅しないという実験データが得られたこと、の 2 点から、新たな創薬標的への切り替えの必要性を感じ、標的分子の探索を行った。

発現を抑制すると赤痢アメーバが死滅、あるいはロックアウト株を作製できない酵素を探した結果、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドキナーゼ (NAD kinase) を見出した (Jeelani ら、Biochimie 2013)。NAD kinase は NAD(H) を NADP(H) へとリン酸化する酵素であり、NAD(H)、NADP(H) は酸化還元反応に関わる分子として細胞内のエネルギー代謝やシグナル伝達に重要な役割を持つ。NAD kinase は生物種により利用できるリン酸基ドナー分子に違いがあり (図 2) (1) ATP のみをドナーとして用いるもの (ヒトの NAD kinase) (2) ATP の他にポリリン酸をドナーとして用いることができるもの (グラム陽性菌の NAD kinase) (3) ATP と他のヌクレオシド 3 リン酸 (GTP など) を用いることができるもの (グラム陰性菌、酵母の NAD kinase) のいずれかに分類される。

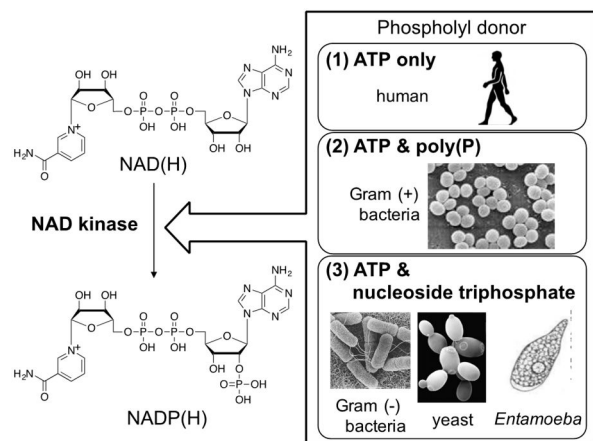


図 2. NAD kinase のリン酸基ドナーは生物により異なる。

赤痢アメーバの NAD kinase は ATP の他に GTP をリン酸基ドナーとして用いることができるため、(3) 型に属するが、系統樹を作成するとグラム陰性菌である大腸菌や酵母 *Saccharomyces cerevisiae* とは大本から異なるクレードに分類される。アミノ酸配列の相同性はヒトや大腸菌、結核菌とは 15-20% と非常に低いが、寄生虫の中でも特に系統樹で近傍に位置するトリパノソーマ原虫とは 88%、リーシュマニア原虫とは 85% と高い。ただし赤痢アメーバの NAD kinase は分子量が両原虫に比べ小さく、これらの事実から明らかにどの生物とも異なる酵素であることが示唆されたため、創薬標的として優れていると考えた。

## 2. 研究の目的

確実に赤痢アメーバに作用する、即戦力となる治療薬シーズを見出すことを目的に、赤痢アメーバの生育に必須で、ヒトを含む他生物のものとは異なる性質を持つ酵素 NAD kinase を標的に選び、阻害化合物を探索する。探索源には構造多様性に富む微生物代謝産物を用いて、赤痢アメーバの NAD kinase を選択的に阻害する天然化合物を見出す。

## 3. 研究の方法

### (1) スクリーニング用微生物培養液の調製

所属機関保有の放線菌および糸状菌は日本国内で採集された。インドネシア産微生物(放線菌および糸状菌)はインドネシア技術評価応用庁 (BPPT) がインドネシア国内で採集したものを輸入した。微生物は 1 種につき 4 種類の培地を用いて試験管で培養した。液体培養は 6 日間振とう (300 rpm, 25°C) し、固体培養は 3 日間前述の条件で振とう後 10 日間 25°C で静置、または 13 日間静置した。培養終了後に培養物と等量のエタノールを加えて 30 分以上振とうし、遠心 (3,000 rpm x 10 min) して上清をスクリーニングに用いた。

### (2) 酵素ベーススクリーニング

大腸菌で発現させた赤痢アメーバの NAD kinase (rEhNADK) および NADPH-dependent oxidoreductase (rEhNO1) は東京大学大学院医学研究科野崎智義教授から供与を受けた (Jeelani ら、Biochimie 2013)。NAD kinase を用いて、96 穴プレートで酵素反応を行い、生成した NADPH を NADPH-dependent oxidoreductase と反応させて検出した。

微生物培養液は 1 well あたり 10  $\mu$ l 使用し、減圧下で溶媒を除去した後、50%DMSO 水溶液 10  $\mu$ l で溶解して酵素反応を行った。

酵素反应用溶液は基質 (それぞれ終濃度  $\beta$ -NADH 2 mM、ATP 1 mM)、発色試薬 iodonitrotetrazolium chloride (INT、0.5 mM)、酵素 (rEhNAD kinase 1  $\mu$ g、rEhNO1 1  $\mu$ g) を Tris-HCl buffer (pH 7.5, 25 mM) 中に混合し、1 well あたり 90  $\mu$ l を微生物培養液サンプル 10  $\mu$ l の入った well に添加して行った。37°C で 30 分インキュベートし、490 nm の吸光度を測定して阻害活性を調べた。

### (3) 細胞ベーススクリーニング

赤痢アメーバの細胞ベーススクリーニングは既報の方法 (Mori ら、Frontiers Cell Infect Microbiol 2018) に従って行った。赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) をシステイン含有培地で培養し、そこへ微生物培養液を添加して赤痢アメーバの生死を顕微鏡観察および WST-1 を用いた発色試験を行い確認した。

### (4) ヒト正常細胞に対する細胞毒性試験

スクリーニングで阻害活性を見出した微生物培養液および化合物は、ヒト正常細胞である繊維芽細胞 MRC-5 に対する毒性を調べた。定法で細胞を培養し、微生物培養液および化合物を添加して細胞毒性を評価した (Mori ら、Frontiers Cell Infect Microbiol 2018)。

### (5) 阻害化合物の精製

スクリーニングで選択した微生物培養液は三角フラスコを用いてスケールアップ培養し、活性の再現性を調べた後、溶媒抽出、各種カラムクロマトグラフィーなどにより精製を行った。化合物は各種機器分析を行い、得られた測定データを文献値と比較して同定した。

## 4. 研究成果

### (1) スクリーニング系の構築

スクリーニング系の構築は東京大学大学院医学研究科野崎智義教授の研究グループと行った。赤痢アメーバの酵素は大腸菌で発現させた。一段目の反応として、リコンビナント Eh NAD kinase により NADH から NADPH を生成させる (図 3 赤)。次の反応では、生成した NADPH をリコンビナント Eh NADPH-dependent oxidoreductase で NADP に変換する (図 3 青)。この過程に INT (iodonitrotetrazolium chloride) を組み合わせたカップリングアッセイで反応の進行を検出する方法を 96 穴プレートに適用した。初めに酵素と基質の添加量、反応時間の最適化を行い、酵素反応による NADPH 生成が検出されることを確認した。

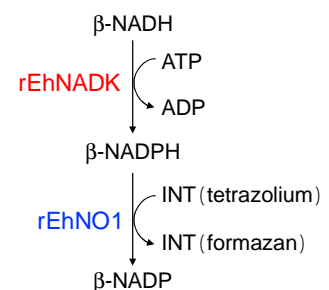


図 3. 酵素反応の流れ。

## (2) 微生物培養液のスクリーニング

日本産の微生物を用いて調製した微生物培養液 640 サンプルを用いて実際にスクリーニングを行ったところ、全体に INT が還元されて生成するホルマザン色素が沈殿しやすくなる傾向が見られた。

次にインドネシア産の微生物を用いて調製した微生物培養液 700 サンプルを用いてスクリーニングを行った。INT ホルマザン色素の沈殿は認められなかったが、ヒットサンプルは見出されなかった。

## (3) 赤痢アメーバ細胞を用いたスクリーニング

並行して赤痢アメーバ細胞に対して選択的に毒性を示す微生物培養液のスクリーニングを行った。

13,000 超の日本産微生物培養液(約 11,500 サンプル)およびインドネシア産微生物培養液(約 1,700 サンプル)をスクリーニングした。日本産微生物培養液からは 191 サンプル(ヒット率 1.7%)、インドネシア産微生物培養液からは 42 サンプル(ヒット率 2.5%)を選択した。NAD kinase 阻害活性を確認できなかったサンプルからも、本スクリーニングで殺赤痢アメーバ活性を示すサンプルを複数見出した。

## (4) 精製対象サンプルの選択方法

赤痢アメーバ選択的細胞毒性サンプルが多数ヒットしたため、これまでに殺アメーバ活性が見出されていないサンプルを精製対象とするためのデレプリケーションを行った。

スクリーニングサンプルを Seppak ODS カートリッジ (Waters) を用いて簡易分画し、活性化化合物の性質(水溶性、脂溶性)を調べた。活性を確認できた画分は LC-UV で分析し、既知殺アメーバ化合物の存在を調べた。

生産微生物の属を簡易同定し、属の情報も化合物同定やグルーピングに活用した。

このようにデレプリケーションを行い、過去に殺アメーバ活性が報告されていないと考えられた化合物の生産菌を選択し、スケールアップ培養を行い目的の化合物が生産されている微生物培養液から活性化化合物を各種クロマトグラフィーにより精製した。

## (5) 放線菌培養液から見出した殺赤痢アメーバ活性化化合物

活性を示した放線菌培養液の殆どは、活性化化合物として cycloheximide が含まれていた。グルタリイミド系化合物 cycloheximide は種々の生物活性が報告されているタンパク質合成阻害化合物であり、殺赤痢アメーバ活性を ED<sub>50</sub> 値約 10 ng/ml (約 36 nM) で示す (Mori ら、未発表データ)。デレプリケーションを行い、cycloheximide ではないと推定される活性化化合物を含む放線菌培養液を選択し、活性化化合物を単離し各種機器分析を行った結果、chartreusin (図 4) と同定した。Chartreusin はタンパク質合成を阻害し、抗ガン活性を示すことが知られている。また、種々の生物活性を示す。ED<sub>50</sub> 値は約 100 μM と強くはなかったが、本化合物の殺赤痢アメーバ活性は初の知見であった。

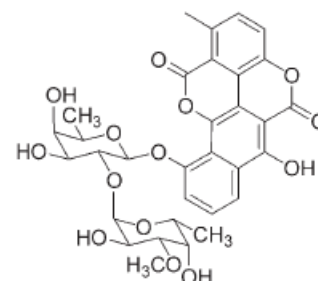


図 4. Chartreusin の構造。

## (6) 糸状菌培養液から見出した殺赤痢アメーバ活性化化合物

デレプリケーションにより、殺赤痢アメーバ活性が既知である fumagillin を含む微生物培養液を多数ヒットサンプルから除いた。

インドネシアの糸状菌培養液から、マイコトキシンとして広く知られる citrinin (図 5) を活性化化合物として同定した。本化合物はヒト細胞に対する毒性 (ED<sub>50</sub> 値約 60 μM) と赤痢アメーバに対する細胞毒性 (ED<sub>50</sub> 値約 30 μM) との間に大きな差が認められなかった。

この 2 化合物は高頻度で見出されたため、同様のスクリーニングを行い、微生物培養液から殺赤痢アメーバ化合物を探索しているインドネシアの研究グループに、fumagillin と citrinin のデレプリケーション法を技術移転した。

さらに、インドネシア産糸状菌 *Aspergillus nomius* の培養液からマイコトキシンである tenuazonic acid (図 6) を単離した。本化合物の殺赤痢アメーバ活性は初の知見であり、ED<sub>50</sub> 値は約 50 μM であった。ヒト細胞に対する毒性 (ED<sub>50</sub> 値約 500 μM) との間に 10 倍の選択性を確認できた。

日本産の *Alternaria* 属など複数の異なる属の糸状菌も、tenuazonic acid を殺赤痢アメーバ化合物として生産していることを LC-UV デ

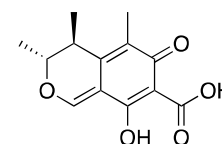


図 5. Citrinin の構造。

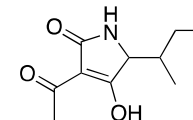


図 6. Tenuazonic acid の構造。

ータで確認でき、tenuazonic acid も本探索でデレプリケーションすべき化合物の一つと考えられた。

#### (7) 今後の展望

NAD kinase アッセイでは、INT 試薬を用いると沈殿が生成し検出が難しくなる事象が認められたことから、可溶性ホルマザン色素である WST-8 へ換えて系を構築する。

微生物の生産する殺赤痢アメーバ化合物の中から、デレプリケーションをすべき高頻度ヒット化合物が複数明らかになり、各化合物のデレプリケーション方法を構築できた。デレプリケーション方法を簡便化してスクリーニングに含め、新規化合物を効率よく見出せるようにしたい。

#### < 引用文献 >

Jeelani, G., et al., Biochemical and functional characterization of novel NADH kinase in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* 2013, **95**, 309-319.

Mori, M. et al. Discovery of antiamebic compounds that inhibit cysteine synthase from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica* by screening of microbial secondary metabolites. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2018, **8**, 409.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mihoko Mori, Satoshi Tsuge, Wataru Fukasawa, Ghulam Jeelani, Kumiko Nakada-Tsukui, Kenichi Nonaka, Atsuko Matsumoto, Satoshi Omura, Tomoyoshi Nozaki and Kazuro Shiomi	4. 巻 8
2. 論文標題 Discovery of Antiamebic Compounds That Inhibit Cysteine Synthase From the Enteric Parasitic Protist <i>Entamoeba histolytica</i> by Screening of Microbial Secondary Metabolites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2018.00409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nurkanto, A.; Jeelani, G.; Yamamoto, T.; Suematsu, M.; Naito, Y.; Hishiki, T.; Mori, M.; Shiomi, K.; Hashimoto, T.; Nozaki, T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Characterization and validation of <i>Entamoeba histolytica</i> pantothenate kinase as a novel anti-amebic drug target.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International journal for parasitology. Drugs and drug resistance	6. 最初と最後の頁 125-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hartuti, E. D.; Inaoka, D. K.; Komatsuya, K.; Miyazaki, Y.; Miller, R. J.; Wang, X.; Sadikin, M.; Prabandari, E. E.; Waluyo, D.; Kuroda, M.; Amalia, E.; Matsuo, Y.; Nugroho, N. B.; Saimoto, H.; Pramisandi, A.; Watanabe, Y.; Mori, M.; Shiomi, K.; Balogun, E. O.; Shiba, T.; Harada, S.; Nozaki, T.; Kita, K	4. 巻 1859
2. 論文標題 Biochemical studies of membrane bound <i>Plasmodium falciparum</i> mitochondrial L-malate:quinone oxidoreductase, a potential drug target	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 191 ~ 200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbabi.2017.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Raekiansyah Muhareva, Mori Mihoko, Nonaka Kenichi, Agoh Masanobu, Shiomi Kazuro, Matsumoto Atsuko, Morita Kouichi	4. 巻 45
2. 論文標題 Identification of novel antiviral of fungus-derived brefeldin A against dengue viruses	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tropical Medicine and Health	6. 最初と最後の頁 32-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41182-017-0072-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Wattanasuepsin, W.; Intra, B.; Panbangred, W.; Euanorasetr, J.; Watanabe, Y.; Fukasawa, W.; Mingma, R.; Mori, M.; Matsumoto, A.; Shiomi, K.	4. 巻 63
2. 論文標題 1-Methoxypyrrole-2-carboxamide - A new pyrrole compound isolated from <i>Streptomyces griseocarneus</i> SW368	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 207-211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 森美穂子、Arif Nurkanto、山下 道雄、Danang Waluyo、Amila Pramisandi、土橋 和之、大村 智、塩見 和朗、野崎 智義
2. 発表標題 インドネシア微生物資源からの抗赤痢アメーバ化合物の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mihoko Mori, Yumiko Saito-Nakano, Satoshi Tsuge, Satoshi Omura, Kazuro Shiomi, Tomoyoshi Nozaki
2. 発表標題 Ovalicin, a fungal metabolite, is effective against a hamster amebic liver abscess model.
3. 学会等名 XIX International Seminar On Amebiasis 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森美穂子
2. 発表標題 糸状菌代謝産物 ovalicin は赤痢アメーバ症肝膿瘍モデルハムスターに対して治療効果を示す
3. 学会等名 2017年度第2回農芸化学会関東支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2017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	野崎 智義  (Nozaki Tomoyoshi)	東京大学・大学院医学研究科・教授  (12601)	