

令和元年6月18日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17926

研究課題名（和文）希少糖はマラリア撲滅の「切り札」となるか？

研究課題名（英文）Are rare sugars potential leads for malaria eradication?

研究代表者

田中 健（Tanaka, Takeshi）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：60750023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：自然界にわずかしが存在しない単糖である希少糖の1種は、マラリア原虫の媒介蚊体内期の発達を阻害する。その作用メカニズムの解明は、マラリア伝播阻止薬の開発に大きく寄与することが期待できる。本研究では、培地中の原虫に複数の希少糖を加えることで、「ヒト体内期の原虫に対する希少糖の効果の観察」および「蚊体内期における発達の阻害は希少糖によるグルコースの取り込み阻害が原因である」という仮説の検証を行った。培地中に加える実験では、希少糖はヒト体内期の原虫に効果を示さなかった。また、その結果から、希少糖による蚊体内期の発達阻害は、グルコースの取り込み阻害によるものではない可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは毎年50万人に迫る死者を出す寄生虫感染症である。近年、第一選択薬であるアルテミシニンが効きにくいマラリア原虫が報告されており、マラリア制圧には「患者の治療」以外の戦略が求められてきた。宿主であるヒトと媒介者である蚊の間での「伝播阻止」は、新たな戦略の一つである。希少糖の一種が「伝播阻止」効果を示すことから、本研究ではその作用メカニズムの解明を行った。その結果、作用メカニズムが当初考えられた「グルコースの取り込み阻害」という単純なものではないことが示唆された。本研究をベースとしたさらなる研究の進展によって、作用メカニズムの解明と伝播阻止薬開発が促進されることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：One of rare sugars inhibits developments of malaria parasites in vector mosquitoes. Elucidation of the mechanism of the action is expected to support developments of malaria transmission blocking drugs. This study was designed to evaluate in vitro effects of rare sugars on the parasite stages in the human blood stream and verify the hypothesis: Inhibition of glucose transport by the rare sugar killed the parasites in the mosquitoes. Addition of the rare sugars to the culture media of the intraerythrocytic and the sexual stages did not show any effects on the parasites. This suggests that the effect of the rare sugar on the parasite developments in the mosquitoes should not be caused by inhibition of glucose transport.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マラリア 薬剤スクリーニング 希少糖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

熱帯熱マラリアは毎年 44 万人以上の犠牲者を出す寄生虫感染症である。数々の抗マラリア薬開発の歴史は薬剤耐性原虫出現の歴史と表裏一体であり、近年相次ぐ耐性原虫の報告は、現在の特効薬アルテミシニンも例外ではないことを警告している。マラリア撲滅を実現するには、現在の主戦略である「患者の治療」に加えて、他の時期をターゲットとする「伝播阻止」と「感染予防」の戦略が必要不可欠である。しかし、「伝播阻止」薬剤を投与された患者自身には利益がないことから、「伝播阻止」戦略に関する研究が特に遅れを見せている。

希少糖の一種である D-allulose をハマダラカに吸わせることで、蚊体内でマラリア原虫の発育を抑えられることが、申請者の所属する講座の予備実験で明らかとなった。この「伝播阻止」法は、薬剤をヒトに投与せずに実施できるという大きな利点をもっているが、「伝播阻止」に必要な希少糖濃度は高く、大規模にマラリア対策キャンペーンを実施するにはさらなる効率化が必要である。そのためには、ターゲット分子を同定し、インビトロで多数の候補希少糖をスクリーニングしながら構造の最適化を行うことが不可欠である。

### 2. 研究の目的

「希少糖はマラリア原虫ヘキソース・トランスポーターをターゲット分子とし、赤血球寄生期、生殖母体、蚊体内期をターゲットとする」という仮説を検証することで、希少糖によるマラリア撲滅の可能性を評価する。

### 3. 研究の方法

(1) リコンビナント・ヘキソース・トランスポーターに対するグルコース取り込み阻害試験：希少糖と同じ単糖類であるグルコースを主要なエネルギー源とする赤血球寄生期は、熱帯熱マラリア原虫ヘキソース・トランスポーター PfHT1 の阻害により増殖が抑制される。本研究では、PfHT1 が希少糖のターゲット分子となりうることを検証するため、希少糖の PfHT1 グルコース取り込み阻害能を評価する。コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により合成した PfHT1 はリボソームと共存させることでプロテオリポソームを形成し、膜タンパク質としてアッセイできる。プロテオリポソーム調製には市販キットを用いる。取り込み阻害は、リポソームに取り込まれる放射性同位体標識グルコースのカウントにより定量する。

(2) 希少糖存在下での原虫グルコース消費量変化の観察：希少糖により PfHT1 が阻害されるのであれば、原虫によるグルコース消費量が減少するはずである。希少糖を加えた培地で赤血球寄生期を培養し、その培養後の培地中のグルコースと希少糖の存在量を HPLC によって測定する。

(3) 原虫に対する薬剤試験：希少糖ライブラリを赤血球寄生期と生殖母体に対してスクリーニングし、抗原虫効果を持つ希少糖を同定する。それぞれ 96 穴プレートを用いて薬剤曝露、生存シグナルは蛍光プレートリーダーで検出することで高効率に行う。生存シグナルとして、赤血球寄生期には原虫 DNA を染色する SYBR green を、生殖母体には酸化還元指示薬である alamarBlue を用いる。

### 4. 研究成果

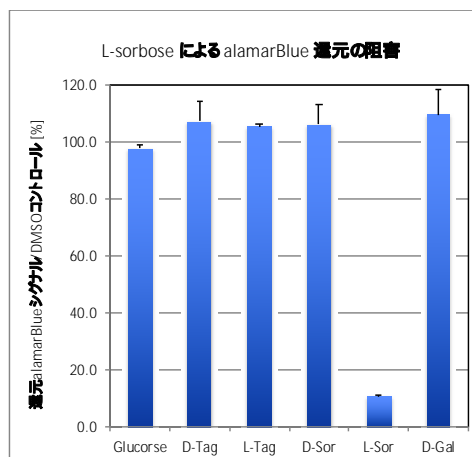
(1) 市販のプロテオリポソームキットである ProteoLiposome Expression Kit (CFS) を使用し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系の専用プラスミドによりヒスチジンタグ付き PfHT1 の発現を行った。SDS-PAGE とウェスタンブロット解析により、タンパク質が十分に発現していることを確認した。このプロテオリポソームを用いて、リポソーム内へのグルコースの取り込み能を評価したが、放射性同位体標識グルコースの取り込みは用量反応関係が観察されなかった。用いたキットでは重層法によりリポソームが形成されるため、プロテオリポソームが二重膜ではなく三重膜以上になっているためにトランスポーターが機能しうる構造になっていない可能性が考えられた。そこで、膜を通過させることを繰り返すことで均一な粒形のリポソームを調製できる Mini-Extruder (Avanti® Polar Lipids) を用いて、二重膜化を試みた。膜の通過は 1 往復は可能であったものの、2 往復目で膜が詰まってしまうため精製を行うことはできなかった。したがって、本キットで調製されたプロテオリポソームは、PfHT1 の解析には不相当であることが明らかとなった。

(2) リコンビナントタンパク質による解析がうまくいかなかったため、培地中のグルコース消費量から希少糖による原虫のグルコース取り込み阻害能を評価することとした。赤血球寄生期の原虫はグルコースを主なエネルギー源とし、PfHT1 の阻害は原虫を死滅させる。用いた希少糖は D-allulose、L-allulose と、マラリア原虫の蚊体内期の発育を阻害する D-allulose の 3 種である。コントロールとして、原虫が消費可能な D-glucose と、原虫が消費できない D-fructose を用いた。完全培地に培地中のグルコース濃度と同程度である 10  $\mu$ M の糖を加えて培養を開始し、3 日後に回収した。グルコース濃度と希少糖濃度を測定した対象は、細胞を加えない培地、非感染赤血球培養後の培養上清、原虫培養後の培養上清、非感染赤血球培養後の非感染赤血球、原虫培養後の感染赤血球 + 非感染赤血球のミックスである。この中、原虫培養後の感染赤血球 + 非感染赤血球の細胞内グルコース濃度は検出限界以下だったため、解析には細胞自体ではな

く、細胞を加えない培地、非感染赤血球培養後の培養上清、原虫培養後の培養上清を用いた。まず、細胞を加えない培地と非感染赤血球培養後の培養上清の比較から、非感染赤血球のグルコース消費量を算出したところ、全ての条件で有意な差は観察されなかった。したがって、希少糖は赤血球に発現しているヒトのグルコース・トランスポーターを阻害せず、グルコースの取り込みと消費に影響しないことが示された。次に、非感染赤血球培養後の培養上清と原虫培養後の培養上清の比較から、原虫のみのグルコース消費量を算出した。その結果、全ての条件で有意な差は観察されなかったことから、希少糖は原虫によるグルコースの取り込みと消費にも影響しないことが示された。また、細胞を加えない培地と原虫培養後の培養上清の比較から、培養中の非感染赤血球 + 感染赤血球によるグルコース消費の総量を計算したところ、先述した非感染赤血球と原虫によるグルコース消費量を足し合わせたものとほぼ一致した。これは、感染赤血球によるグルコース消費の主体は原虫であり、それが感染赤血球のグルコース消費のほぼ全てであることを示している。さらに、原虫による希少糖の取り込みと消費の可能性を評価するために、非感染赤血球培養後の培養上清と原虫培養後の培養上清中の希少糖濃度を測定した。その結果、原虫には消費できない D-fructose と同程度の濃度で希少糖が検出され、非感染赤血球培養後のものと原虫培養後のものとで有意な差は観察されなかった。以上の結果から、原虫のグルコース取り込みは、培地中のグルコース濃度と同程度である 10  $\mu$ M もの希少糖によっても阻害されないことが明らかになった。また、熱帯熱マラリア原虫のゲノム配列から予想された通り、原虫は希少糖を代謝できないことが示唆された。

(3) PfHT1 の阻害が原虫を死滅させることが報告されていることは、原虫の生存/死滅がグルコース取り込みの指標の一つとなり得ることを示している。完全培地に培地中のグルコース濃度と同程度である 10  $\mu$ M の糖を添加し、72 時間培養後、原虫 DNA に結合する SYBR green により原虫の増殖への影響を評価した。用いた糖は先の実験のコントロールの 2 種と希少糖 3 種に加えて、D-tagatose、L-tagatose、D-sorbose、L-sorbose、D-mannose の 5 種の希少糖である。結果、SYBR green のシグナルに違いがなかったことから、全ての希少糖は赤血球寄生期の原虫の増殖に影響しないことが明らかとなった。本実験にはステージを同調しない原虫を用い、1.5 サイクルにあたる 72 時間培養を行なっていることから、顕微鏡下で赤血球内寄生期の全てのステージに対する形態変化の観察が可能である。各条件の培養からギムザ染色塗抹標本を作成し、顕微鏡下で観察した結果、リング体からシゾン期の全ての原虫に形態の変化は見られなかった。特にグルコースを多量に要求するステージであるトロフォゾイトとシゾンに変化が見られなかったことは、実験に用いた希少糖は原虫のグルコース取り込みを 10  $\mu$ M という高濃度でも全く阻害しないことを示している。原虫のゲノム上にコードされているグルコースを取り込むことができるタンパク質は HT1 のみである。したがって、以上の実験結果から、D-allose による蚊体内期原虫の発育阻害は、PbHT1 の阻害によるグルコースの取り込み阻害が原因ではないことが強く示唆された。

(4) 希少糖が殺生殖母体効果を示せば、伝播阻止薬のリード化合物として有望である。既存の抗マラリア薬が効かない成熟生殖母体の培養に、培地中のグルコース濃度と同程度である 10  $\mu$ M の糖を添加し、72 時間培養後、細胞の酸化還元活性の指示薬である alamarBlue により殺生殖母体活性を評価した。用いた糖は、コントロールである D-glucose と D-fructose、希少糖である D-allulose、L-allulose、D-tagatose、L-tagatose、D-sorbose、L-sorbose、マラリア原虫の蚊体内期の発育を阻害する D-allose である。その結果、L-sorbose 以外の希少糖は、殺生殖母体効果を示さなかった。その一方で、L-sorbose は 90% 以上の阻害効果を示した(右図)。各条件の培養からギムザ染色塗抹標本を作成し、顕微鏡下で観察した結果、全ての標本で生殖母体は減少しておらず、形態変化も見られなかった。したがって、L-sorbose による殺生殖母体効果は偽陽性であったことになる。alamarBlue は酸化還元指示薬であり、生細胞は alamarBlue を還元し、還元された alamarBlue が蛍光を発することで生細胞数を評価する。したがって、L-sorbose は、原虫内の何らかの代謝系を阻害することで alamarBlue の還元を阻害するが、その代謝系は単独では赤血球寄生期の増殖にも生殖母体の生存にも重要な役割を担っていないことが示唆された。



以上を総括する。本研究で用いた希少糖は「患者の治療」や、生殖母体を標的とした「伝播阻止」のためのリード化合物としては不適當であることが明らかとなった。また、D-allose が示した蚊体内期の原虫の発達阻害は、ヘキソース・トランスポーターを標的としたグルコース取り込み阻害によるものではないことが強く示唆された。D-allose による蚊体内期の作用機序の解明は今後の D-allose をリードとした伝播阻止薬開発に必須であることから、本研究の成果をベースとしたさらなる研究が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。