

機関番号：34428

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～ 2010

課題番号：19370043

研究課題名（和文）

トリパノソーマ及びマラリアの新規治療薬を目指したキーとなる酵素の構造解析

研究課題名（英文） Structure analyses of key enzymes from trypanosoma and malaria for the development of new drugs

研究代表者

芳本 忠（YOSHIMOTO TADASHI）

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：60088870

研究成果の概要（和文）：

トリパノソーマやマラリアは多くの患者がありながら有効な治療薬が少なく熱帯地方で多くのヒトが亡くなっている。我々は新規治療薬を目的として、原虫の代謝系酵素に焦点を当て、酵素とその阻害剤を研究した。

(1) マラリア原虫のメチオニンアミノペプチダーゼ阻害剤：プロリルアミノペプチダーゼを用いた新規メチオニンアミノペプチダーゼ測定系を開発し、メチオニンアミノペプチダーゼ阻害化合物のスクリーニングを行った。

(2) トリパノゾーマのオリゴペプチダーゼB：酵素の結晶化を行い、結晶構造解析を行った。結晶パラメータは、格子定数 $a = b = 123.9$, $c = 248.0$ Å, $\gamma = 120^\circ$ を持つ、単純格子の三方晶系(*P* hexagonal)に属する結晶系であることを明らかにした。

(3) アミノペプチダーゼNとプロリルオリゴペプチダーゼに対する特異的阻害剤についても研究した。

研究成果の概要（英文）：

Since there is no effective medicine for infectious disease caused by Trypanosoma and malaria, many peoples live in tropical were killed. In order to develop new drugs for these, we focused to metabolic enzymes in Trypanosoma and malalia as target, and studied specific inhibitors.

(1) Methionine aminopeptidase from *P. falciparum*; We develop new assay method of methionine aminopeptidase using prolyl aminopeptidase. We cloned the enzyme gene and expressed in *E. coli*. Using the new assay method, specific inhibitor have been screened. A family of structurally related inhibitors containing a 2-(2pyridinyl)- pyrimidine was identified in compound library. Inhibitors were also found in microbial products and plant extract.

(2) Oligopeptidase B from trypanosomiasis : The enzyme plays a key role in the pathogenesis of trypanosomiasis. We found protamine act unique and potent inhibitor for oligopeptidase B from trypanosoma. In order to clarify the mechanism of inhibition, we crystallized the enzyme and studied X-ray crystallography. The crystallographic parameters were $a=b=123.9$, $C=248.0$ A $\gamma=120$ degree and *p* hexagonal.

(3) Specific inhibitors for aminopeptidase N and prolyl oligopeptidase from them were also studied.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
平成 20 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
平成 21 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
平成 22 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：マラリア、トリパノゾーマ、オリゴペプチダーゼ B、阻害剤、医薬品

1. 研究開始当初の背景

抗マラリア薬はキニーネが古くから用いられ、新たに開発したクロロキンが耐性の出現と視覚障害などの薬害問題を起こしたことはよく知られている。その後、スルファドキシム/ピリメタミン合剤が用いられているが、良いマラリア薬の開発が求められている。現在、S-アデノシル-L-ホモシステイン加水分解酵素の阻害剤、ミトコンドリアの呼吸鎖を阻害するアトバコンやアピコプラスト。漢方薬ジョウザンアジサイの根部からのフェブリフジン類や合成薬1,2,4,5-テトラオキサシクロアルカン類などが研究されている。

抗トリパノゾーマ薬としては、古くはエーリッヒと秦左八郎により合成されたサルバルサンやトリパン赤がトリパノゾーマ感染症に用いられてきた。最近ではアスコフラノン、スラミンや GPI トランスアミダーゼ阻害剤の研究があるが、マラリアに比べると更に開発研究が少なく、治療薬が無く大きな問題となっている。

2. 研究の目的

トリパノゾーマのオリゴペプチダーゼ B 酵素とマラリアのメチオニンアミノペプチダーゼに焦点を当て、構造解析と阻害剤の開発を行う。アフリカ睡眠病やマラリア病は患者数が多いにも関わらず、有効な治療薬の開発が遅れている。本研究では感染防御のターゲットとなるオリゴペプチダーゼ B やメチオニンアミノペプチダーゼの構造を研究し新規な治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) トリパノゾーマのオリゴペプチダーゼ B の研究 (芳本)

トリパノゾーマのオリゴペプチダーゼ B 遺伝子をクローニングし、発現ベクターに組み込み大腸菌で高発現する。更に、30リッターの培養で酵素を大量培養し、精製酵素を得る。種々の沈殿剤を用いハンギングドロップ蒸気拡散法でトリパノゾーマのオリゴペプチダーゼ B の結晶を得る。

(2) マラリアのメチオニンアミノペプチダーゼの研究 (中嶋・芳本)

メチオニンアミノペプチダーゼについても大腸菌で発現し組換え菌をジャーファメ

ンターで培養し、菌体破碎液より酵素の精製を行い、結晶化を行う。

(3) マラリア原虫のメチオニンアミノペプチダーゼの研究 (伊藤)

マラリアのメチオニンアミノペプチダーゼについて、ヒト由来のメチオニンアミノペプチダーゼとの比較研究に主をおいて行う。マラリア酵素に特的な阻害剤の開発を行う。

4. 研究成果

(1) トリパノゾーマのオリゴペプチダーゼ B がキー酵素である。トリパノゾーマのオリゴペプチダーゼ B 遺伝子をクローニングし、発現ベクターに組み込み大腸菌で高発現することに成功している更に、30リッターの培養で、菌体破碎液から Ni カラムと DEAE-Toyopearl カラムクロマトグラフィーにより約 1 g の精製酵素を得ることに成功した。予備実験としてはあるがハンギングドロップ蒸気拡散法でトリパノゾーマのオリゴペプチダーゼ B の結晶を得た。酵素の結晶解析を行い、結晶パラメータ、格子定数 $a = b = 123.9$, $c = 248.0$ Å, $\gamma = 120^\circ$ を持つ、単純格子の三方晶系 (P hexagonal) に属する結晶系であることを明らかにした。

(2) マラリアのメチオニンアミノペプチダーゼがキー酵素である。マラリアのメチオニンアミノペプチダーゼ遺伝子をノックアウトすると致命的となり、細胞分裂に関与する。

マラリア原虫のメチオニンアミノペプチダーゼ阻害剤：土壌微生物を培養し、生産物がメチオニンアミノペプチダーゼを阻害力をスクリーニングし比較的阻害力のある菌株を得た。一方、化学合成により類似化合物をスクリーニングし、幾つか強い阻害力を持つ化合物を得た。

(3) アミノペプチダーゼ N に対する特異的阻害剤：病原微生物は共通してアミノペプチダーゼ N 活性を持つため、酵素を精製し酵素化学的性質を検討した。更に、大腸菌の酵素の立体構造を基に化合物をデザインし、より強力な阻害物の設計を行った。

(4) *Moraxella lacunata* のオリゴペプチダーゼ B：酵素を大腸菌で発現させ精製し結晶化を行った。特異的な阻害剤をデザインし阻害力を調べた。

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6件)

- 1, Substitution of Glu122 by glutamine revealed the function of the second water molecule as a proton donor in the binuclear metal enzyme, creatininase, Yamashita, K., Nakajima, Y., Matsushita, H., Nishiya, Y., Yamazawa, R., Wu, Y., Matsubara, F., Oyama, H., Ito, K., and Yoshimoto, T., *J. Mol. Biol.* (2010)
- 2, ペプチド最終分解系に関するエキソペプチダーゼの構造と機能、伊藤潔、中嶋義隆、田中信忠、芳本忠 生化学 81,-5-16 (2009)
- 3, Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* complexed with the transition state analogue aminophosphinic inhibitor PL250, Marie-Claude Fournié-Zaluski, Hervé Poras and Bernard P. Roques, Yoshitaka Nakajima, Kiyoshi Ito and Tadashi Yoshimoto, *Acta Crystal. D.* 65, 814-822 (2009)
- 4, Closed Complex of the D-3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase Induced by an Enantiomeric Competitive Inhibitor: Importance of Gln196 in Stable Ternary Complex Formation. Kanako Nakashima, Kiyoshi Ito, Yoshitaka Nakajima, Ryuji Yamazawa, Syunsuke Miyakawa, and Tadashi Yoshimoto *J. Biochem.* 145, (4) 467-479 (2009)
- 5, Dipeptidyl Aminopeptidase IV from *Stenotrophomonas maltophilia* Exhibited 4-Hydroxyproline Residue. Nakajima, Y., Ito, K., Toshima, T. Egawa, T., Zheng, H., Oyama, H., Wu, Y-F., Takahashi, E., Kyono, K., and Yoshimoto, T., *J. Bacteriol.* 190 (23) 7819-7829 (2008)
- 6, 微生物酵素の生化学的および構造生物学的研究と医療への応用、芳本忠、薬学雑誌 127, 1035-1045 (2007)

[学会発表] (計41件)

- 1, Sixth General Meeting of the International Proteolysis Society, 2009年10月28日 Gold Coast (Australia)
- 2, プロリン特異性ペプチダーゼ生化学会シンポジウム 2009年10月22日、神戸
- 3, 歯周病菌プロリルトリペプチジルアミノペプチダーゼの基質N末端認識に関する Glu636 第13回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会学術集 2008年8月22日、大阪
- 4, 4-Hys基質に活性を示す S. *maltophilia*由来ジペプチジルアミノペプチダーゼIVの構造的特徴 日本生化学会九州支部例会九州大学、2008年5月17日、福岡

5, 大腸菌アミノペプチダーゼ N の基質認識機構 日本薬学会第 128 年会 (パシフィコ横浜) 2008 年 3 月 27 日

6, The three dimensional structure of aminopeptidase N and wide substrate recognition mechanism International Proteolysis Society 2007 年 10 月 23 日、パトラス (ギリシャ)

[図書] (計2件)

- 1, 芳本 忠、生化学辞典 今堀和友、山川民夫監修 東京化学同人 (2008)
- 2, 伊藤潔、中嶋義隆、芳本 忠、病原菌の戦い、構造生物学 倉光、杉山編 共立出版 (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳本 忠 (YOSHIMOTO TADASHI)

摂南大学・理工学部・教授

研究者番号：60088870

(2) 研究分担者

伊藤 潔 (ITO KIYOSHI)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50201926

中嶋義隆 (NAKAJIMA YOSHITAKA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80372770