

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2010
課題番号：19380068
研究課題名（和文）昆虫由来の活性物質を利用した新規抗トリパノソーマ薬剤開発のための基盤的研究
研究課題名（英文）Basic research on anti-trypanosomal drug discovery using bioactive substances derived from insect
研究代表者 石橋 純 (ISHIBASHI JUN)
独立行政法人農業生物資源研究所 生体防御研究ユニット ユニット長
研究者番号：20391576

研究代表者の専門分野：農芸化学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生理活性物質

1. 研究計画の概要

本研究の目的は、(1)これまでに我々が開発した昆虫ディフェンシン由来の改変ペプチドが真核生物であるトリパノソーマに対しては、如何なる作用機構で効果を示すのかを明らかにすることにより、新たな抗トリパノソーマ薬剤の開発のための基礎的知見とする。(2)タイワンカブトムシの体液中に存在する抗トリパノソーマ活性物質を単離し、構造を決定する。また、カイコ等の他の昆虫からスクリーニングを行い、新たな抗トリパノソーマ活性物質を探索し、構造決定を行う。以上のことから、画期的なトリパノソーマ感染症に対する新規薬剤開発のための基盤を築くことである。

2. 研究の進捗状況

(1)トリパノソーマ原虫に対するカブトムシディフェンシン由来改変ペプチドの作用点を明らかにするため、膜電位感受性の蛍光色素で血流型のトリパノソーマ原虫を標識し、フローサイトメトリーで解析を行ったところ、改変ペプチドが細胞膜の脱分極を引き起こしていることが明らかになった。また、電子顕微鏡観察を行ったところ、改変ペプチドにより細胞膜が破壊されていることが明らかになった。トリパノソーマの細胞膜の膜組成を測定したところ、酸性リン脂質のフォスファチジルセリンを含むことが明らかになった。このことから真核生物であるトリパノソーマも負電荷を帯びた細胞膜を持ち、改変ペプチドにより攻撃を受けることが示唆された。

(2)昆虫由来の抗トリパノソーマ活性物質を探索したところ、カイコ蛹抽出物に強い抗ト

リパノソーマ活性を見出した。カイコ蛹を抽出し、Sep-pakC18 カートリッジおよび二段階の逆相 HPLC により活性物質の単離を行った。H1 および C13 核磁気共鳴スペクトルおよび質量分析により構造決定を行ったところ、活性物質はビタミン B2 として知られるリボフラビンであると同定された。リボフラビンは光分解により、細胞毒性を示すルミクロームを生じる。In vitro では、通常の室内の光条件では強い活性がみられたものの、全暗条件では弱い活性しか示さなかったことから、活性の本体はリボフラビンの光分解物であると考えられた。トリパノソーマ原虫を腹腔内注射により感染させたマウスにリボフラビンを経口投与したところ、特別な光照射のない条件において、血中の原虫の増加およびマウスの死を有意に遅らせた。一方、腹腔内注射しても治療効果はみられなかった。また、リボフラビンおよびルミクロームは経口投与で同等の延命効果を示した。リボフラビンは摂取に対する安全性は確認されており、安全で経口投与可能な薬剤が存在しないトリパノソーマ症に対する薬剤として、新たな可能性を示すものである。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(1)の昆虫ディフェンシン由来改変ペプチドのトリパノソーマに対する作用機構は、真核生物であるトリパノソーマにおいても細胞膜が作用点であることを解明した。そのリン脂質組成を解析したところ、酸性リン脂質であるフォスファチジルセリンが含まれることから、他の細菌やガン細胞と同様に電気的な相互作用で吸着し、細胞膜を破壊すること

が解明された。(2)の昆虫由来新規抗トリパノソーマ活性物質の単離については、カイコ蛹よりリボフラビンを単離した。ビタミン B2 として知られるリボフラビンの抗トリパノソーマ活性については、非常に意外性のある成果であり、今後の抗トリパノソーマ薬の開発に大いに貢献するものである。さらに他の昆虫からの抗トリパノソーマ活性物質の存在を明らかにし、現在単離を進めている。

4. 今後の研究の推進方策

リボフラビンについて in vivo の治療効果を詳細に解析する。他の昆虫からの新規抗トリパノソーマ活性物質の単離を行う。

5. 代表的な研究成果

(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)

Yamage M, Yoshiyama M, Grab DJ, Kubo M, Iwasaki T, Kitani H, Ishibashi J & Yamakawa M Characteristics of Novel Insect Defensin-Based Membrane-Disrupting Trypanocidal peptides Biosci. Biotech. Biochem. 2009, 73, 1520-1526

[学会発表] (計3件)

芳山三喜雄・小野裕嗣・山川稔・石橋 純 昆虫由来抗トリパノソーマ活性物質の探索 日本蚕糸学会、H21.3.21、東京農工大学 Mikio Yoshiyama, Hiroshi Ono, Minoru Yamakawa and Jun Ishibashi An anti-trypanosomal substance from an insect; riboflavin is effective via oral administration, Keystone Symposia Drug Discovery for Protozoan Parasites, H21.3.23, コロラド州ブレックケンリッジ

芳山三喜雄・小野裕嗣・山川稔・石橋 純、昆虫由来抗トリパノソーマ活性物質の探索、日本農芸化学会、H21.3.28、マリンメッセ福岡

[図書] (計1件)

分子昆虫学—ポストゲノムの昆虫研究—神村 学・葛西真治・畠山正統・日本典秀・竹内秀明・石橋 純編

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：抗トリパノソーマ薬

発明者：石橋 純・芳山三喜雄・小野裕嗣・山川 稔

権利者：農業生物資源研究所、食品総合研究所

種類：特許

番号：特願 2008-298492

出願年月日：H20.11.21

国内外の別：国内