

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06970

研究課題名(和文) 抗原虫活性物質の結合タンパク質同定による新規創薬ターゲットの開拓とその応用

研究課題名(英文) Identification of the anti-protozoal compound binding protein for the development and application of novel drug targets.

研究代表者

石山 亜紀 (Ishiyama, Aki)

北里大学・感染制御科学府・特任助教

研究者番号：70300746

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)：チロシンキナーゼが存在しないマラリア原虫において、nilotinibが抗マラリア原虫活性を示すことから新たな作用メカニズムと創薬ターゲットの存在が示唆される。マラリア原虫のnilotinib結合タンパク質として見出したpfelF4Aはマラリア原虫には必須であり単独ではDNA、RNA helicase活性が報告されている。小麦タンパク質発現系にてrpfelF4Aを取得し活性を確認した。DNA helicase活性の確認はできなかった。ATPase活性は弱いながら確認できたが、基質依存性のATPase活性は見られなかった。活性発現がタンパク質発現方法あるいは基質に起因するのかが確認する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PfelF4Aは過去大腸菌を用いたタンパク質発現系で取得され、DNA、RNA helicase阻害活性、ATPase阻害活性が見出された。本研究ではpfelF4Aを小麦胚芽抽出液を用いた無細胞系で取得し、これら活性の再現が十分ではなかった。その要因についてより詳細に検討することでより正確なpfelF4Aの特性が解明される。マラリア治療薬に対する薬剤耐性化が終わらない状況下でpfelF4A阻害を作用機序にもつ薬剤が見出されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Nilotinib shows inhibitory activity against Plasmodium falciparum, which is absent in tyrosine kinase, therefore, predicted some new mode of action sites that could be a novel target to discover anti-malarial drugs.

PfelF4A, a Nilotinib binding protein of P. falciparum, was first discovered by target protein fishing method using parasite lysate. This protein is essential for parasite survival, and it was reported that DNA and RNA helicase activity by itself. The recombinant pfelF4A was obtained by the wheat germ protein expression system and assessed in these activities. Unfortunately, the DNA helicase activity was not observed on the partial duplex linear DNA or fork duplex on the M13 single-strand plasmid DNA substrate. The ATPase activity was slightly shown however it was not depending on the DNA substrate. To solve the loss of rpfelF4A enzymatic activity, it is needed farther studies for involving the difference of protein expression method or substrate characteristics.

研究分野：熱帯病創薬

キーワード：pfelF4A マラリア原虫 結合タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアおよび Neglected Tropical Diseases(NTDs)であるトリパノソーマ症、リーシュマニア症は、熱帯、亜熱帯地域を中心に蔓延する原虫感染症である。今もってなお多くの人々の生命、生活を脅かしており、世界的に征圧されるべき原虫感染症として認識されている。現行の治療薬に対する耐性原虫の蔓延と出現、副作用といった問題などから新たな骨格、作用メカニズムを持つ治療薬の開発が常に求められている。研究代表者の所属研究室ではマラリア原虫、トリパノソーマ原虫、リーシュマニア原虫の培養原虫あるいは動物原虫感染モデルを用いた抗原虫活性物質の探索研究を行っており、今までに創薬シードとして既存薬とは異なるユニークな骨格を持つ抗原虫活性物質を多数見出している。化学合成的手法による構造活性相関の解明を基盤とした創薬研究を中心に推進しているが、作用メカニズムは未解明のままである。見出された化合物の抗原虫作用標的を明らかとし、ユニークな骨格を生かした創薬展開の加速、さらに、解明された標的を基盤とする新たな創薬ターゲットを抗原虫薬シード探索に応用し、真に効果のある創薬リード化合物の創出が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ユニークな骨格を持つ抗原虫活性物質を中心に、それぞれの起因原虫を用いた target protein fishing を適用することで作用標的を明らかとし、創薬展開の加速、新規創薬ターゲットの開拓とその応用を目指すことである。

これまで、種々活性物質の中でチロシンキナーゼを持たないマラリア原虫に対しチロシンキナーゼを分子標的とする慢性骨髄性白血病治療薬の nilotinib が抗マラリア原虫活性を示したことに着目し、マラリア原虫の Nilotinib 結合タンパク質として DNA, RNA helicase (pfeIF4A) と膜タンパク質 A を同定した。本研究では、(1) pfeIF4A、膜タンパク質 A のバリデーションを進め、標的を基盤とする新たなスクリーニングによって真に効果のある創薬リード化合物を見出すこと、(2) 新たな結合タンパク質を同定し(1)と同様に創薬リード化合物を見出すことである。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗マラリア原虫活性物質 nilotinib の未同定結合タンパク質の同定

未同定結合タンパク質は SDS-PAGE 上のバンドを切り出し保存しており、これを LC-MS/MS 解析にて同定した。

### (2) pfeIF4A のバリデーション

#### (2)-1. リコンビナント pfeIF4A (rpfeIF4A) の取得

大腸菌頻用コドンで最適化した pfeIF4A の塩基配列を合成遺伝子として作成し、pET システムを用いた大腸菌発現系、及び無細胞タンパク質発現系(大腸菌、コムギ胚抽出液)にて rpfeIF4A の取得を行った。

#### (2)-2. DNA helicase assay および ATPase 阻害活性の測定

DNA helicase assay では、基質として single-strand overhang 型 SH1<sup>1)</sup>(Alexa-488-5' - GCCTCGCTGCCGTCGCCA-3' , 5' -TGGCGACGGCAGCGAGGCT<sub>18</sub>-3' をアニール )と、Plasmid 型 M13<sup>2)</sup>(M13mp19 plasmid の一部を Alexa488-5' - T<sub>15</sub>GTTTCCAGTCACGACT(15)-3' とアニールさせた基質)を作成した。

rpfeIF4A および基質は 50:1-10:1 の比率 (rpfeIF4A:897nM-25nM) で helicase assay buffer

(25mM Tris-HCl pH8.0, 10-20mM KCl or 20mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 0.8-1.6 mg/mL BSA, 1mM DTT)共にインキュベーション(37℃, 2-24時間)<sup>1,3)</sup>を行なった。反応停止バッファーを加え、全量を15% SDS PAGE あるいは 12% non-SDS PAGEを行なった。

ATPase活性の測定では、*rpfeIF4A*および基質(5'-GACGCTGCCGAATTCTGGCTTGSS(ssHS7)<sup>1)</sup>) 50:1の存在及び非存在下でATPase assay buffer(25mM Tris-HCl pH8.0, 20mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM ATP, 1mM DTT)共にインキュベーション(37℃, 2-24時間)を行なった。反応液中の遊離リン酸は高感度マラカイトグリーンアッセイ<sup>4)</sup>にて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗マラリア原虫活性物質nilotinibの未同定結合タンパク質の同定

未同定結合タンパク質はLC-MS/MS解析を行い、新たに以下の二つの結合タンパク質を同定した。

Endoplasmic reticulum chaperone protein (PF3D7\_1222300)

Heat shock protein 70 (PF3D7\_0917900)

両者とも、HSP90のファミリータンパク質であり、HSP90の阻害剤は抗マラリア原虫活性を示すことが報告されている。

##### (2)-1. *rpfeIF4A*の取得

pETシステムを用いた大腸菌発現系では、Stratageneより入手したBL21(DE3)pLysSにトランスフェクションして得たシングルコロニーあるいは全コロニーを400mLの2xYT(pH7.0)に植菌し、37℃、o/nで培養、O.D. 0.3-0.4で0.5mM IPTGを添加、3-4時間の培養を行った時にSDS-PAGE上に目的の大きさと思われるバンドが確認された。*pfeIF4A*と推定された精製フラクションを回収しウェスタンブロットでHis-tagの検出を行ったが、シグナルは観察されなかった。このタンパク質のアミノ酸配列を確認したところ、大腸菌由来のタンパク質(eFTu)であることが判明した。以降、培養条件を種々検討したが、タンパクの発現は見られなかった。また、大腸菌S30成分をメインとした無細胞タンパク質発現ではpETシステムプラスミドを用いて行った限りではタンパク質の発現が確認できなかった。

コムギ胚抽出液を用いた無細胞タンパク質では、発現プラスミド(N末 His-Tag)を鋳型として転写反応にてmRNAを合成し、これを用いて重層法で15-20時間の翻訳反応を行った。反応液を精製しHis-Tagタンパク質を取得、バッファー交換を行った。取得した*pfeIF4A*の分子量は48.5 kDaで89μg/mL(0.76mL, 1.83μM)であった。

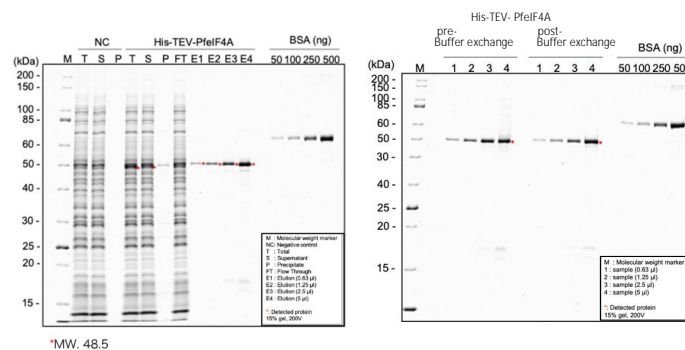


図1 コムギ胚抽出液を用いた無細胞タンパク質合成システムによる *pfeIF4A* 発現

##### (2)-2. DNA helicase assay およびATPase阻害活性の測定

pfeIF4Aは単独でDNA, RNA helicase 活性、ATPase活性を示すことが報告されている。今回得られたrpfeIF4A について、DNA helicase活性を検討した。種々条件(酵素濃度, 基質濃度, ATP, GTP, MgCl<sub>2</sub> 濃度, 反応時間)を行ったが、DNA helicase活性の確認はできなかった。

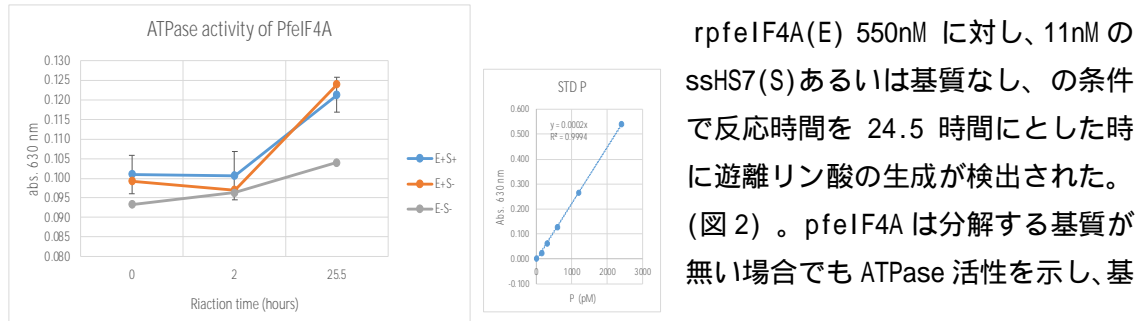


図 2. rpfeIF4A の ATPase 活性

質(ssDNA, dsDNA)の存在下で活性が高くなるとの報告がある<sup>1)</sup>。しかしながら、今回得られた結果から基質依存性の分解であるかの判断が出来なかった。

活性発現がタンパク質発現の方法に起因するか、あるいは用いた基質などに起因するの  
かを確認する必要がある。

#### <引用文献>

- 1) Protein expression and purification,85:1-8(2012)
- 2) Nucleic Acids Research,20:5329-533(1992)
- 3) Molecular & Biochemical Parasitology,144:133-141(2005)
- 4) Journal of Visualized Experiments,114:e54305(2016)

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------