

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590495

研究課題名(和文) 熱帯熱マラリア原虫由来非メバロン酸経路酵素群に関する構造機能相関研究

研究課題名(英文) Structure-activity relationship studies of the enzymes belonging to the non-mevalonate pathway of *Plasmodium falciparum*

研究代表者

田中 信忠 (Tanaka, Nobutada)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：00286866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯熱マラリア原虫の感染で発症するマラリアにより、年間数百万人の死者が出ている。薬剤耐性原虫の出現により、新規抗マラリア薬の開発が求められている。ホスミドマイシンは、ガボンおよびタイで行われた第二相臨床試験の結果からマラリアの治療に有効であることが示されている。その作用機序は、ヒトに存在しない代謝経路である非メバロン酸経路中の酵素DXR (PfDXR) を阻害することによるものである。本研究では、新規ホスミドマイシン類似体数種とPfDXRとの複合体の結晶構造解析に成功した。それら阻害剤のいくつかは、ホスミドマイシンより強力な阻害活性を示す。本研究の成果は、より強力な新規抗マラリア薬開発に役立つ。

研究成果の概要(英文)：The human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is responsible for the death of more than a million people each year. The emergence of strains of this malaria parasite resistant to conventional drug therapy has stimulated the search for antimalarials with novel modes of action. Fosmidomycin has proved to be efficient in the treatment of uncomplicated *P. falciparum* malaria in recent clinical trials conducted in Gabon and Thailand. It has a novel mode of action through the inhibition of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR), an enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis, which is absent in humans. In this study, we have successfully determined the crystal structures of *P. falciparum* DXR (PfDXR) in complex with alpha-aryl substituted fosmidomycin analogues, some of which have higher inhibitory activities (15 to 100 nM) against PfDXR. We expect present structures to be useful guides for the design of more effective antimalarial compounds.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：マラリア 非メバロン酸経路 ドラッグデザイン

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、ハマダラ蚊により媒介される原虫性疾患である。ヒトに感染するマラリア原虫として、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*)、およびサルマラリア原虫の一種 (*P. knowlesi*) の5種類が知られている。これらのマラリア原虫の中で最も危険な原虫である *P. falciparum* の感染によって発症する疾患が、熱帯熱マラリアである。熱帯熱マラリアでは、発熱、意識混濁、発作、昏睡という症状を引き起こし、ヒトを死に至らしめることさえある。マラリアの発症者数は、年間数億人にも達し、2)死者は100~300万人と見積もられている。また、マラリアの発生は、熱帯・亜熱帯地域が主流だが、近年の地球温暖化の進行により温帯地域にまで拡大している。既存の抗マラリア薬の代表例としては、キニーネ (quinine)、クロロキン (chloroquine)、プログアニル (proguanil)、アルテミシニン (artemisinin)、アトバコン (atovaquone) 等が挙げられる。これらの抗マラリア薬は単独あるいは他の薬剤との併用により優れた治療効果を示すが、広く使用されている抗マラリア薬に関しては、薬剤耐性マラリア原虫の出現が報告されている。従って、新規作用機構を有する抗マラリア薬の開発が求められている。

ステロイドやカロテノイドなど動物や植物の生存に重要な役割を担うイソプレノイド化合物は、五炭素化合物であるイソペンテニル二リン酸 (isopentenyl diphosphate; IPP) を単位とする縮合によって生成される。ヒトにおいて、IPP は、酢酸と CoA を出発物質として 3-ヒドロキシ 3-メチルグルタリル CoA (HMG-CoA) からメバロン酸 (MVA) を経る、いわゆる「メバロン酸経路」によって生成される。この経路の律速段階は HMG-CoA 還元酵素 (HMGR) によって HMG-CoA が還元されてメバロン酸を生じる反応である。HMGR 阻害剤としてスタチン類 (例えば、わが国で開発されたメバロチンなど) が知られており、高脂血症治療薬として世界中で使用されている。IPP の生合成は全生物においてメバロン酸経路によるものであると信じられていたが、フランスの Rohmer 教授らにより、ある種の細菌においてメバロン酸経路とは全く異なる代謝経路によって IPP が生合成されることが示された。この代謝経路は、ピルビン酸とグリセルアルデヒド 3 リン酸を出発物質として IPP を生じる経路であり、「非メバロン酸経路」と呼ばれている。

1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) は、NADPH および 2 価の金属イオン存在下で 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP) から 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) への反応を触媒する非メバロン酸経路 2 番目の

酵素である。1999 年、ドイツの Jomaa 博士らは、(1) 熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* における IPP の生合成が非メバロン酸経路に依存していること、(2) 既存の抗生物質であるホスミドマイシン (fosmidomycin, 3-(N-formyl-N-hydroxyamino)propyl-phosphonate) が *P. falciparum* の非メバロン酸経路 2 番目の酵素である PfDXR を阻害することによりマラリア原虫の生育を *in vitro* で抑制すること、(3) マラリア原虫に感染させたマウスの治療にホスミドマイシンの投与が有効であることを報告した。PfDXR の阻害が *in vitro*, *in vivo* の両方で *P. falciparum* の生育を阻害し、なおかつ DXR は人間には存在しない非メバロン酸経路の酵素であることから、Jomaa らの報告以来 PfDXR が抗マラリア薬の理想的標的として注目されている。実際、ホスミドマイシンは、リンコマイシン系抗生物質 (リボソーム 50S サブユニットを阻害) であるクリンダマイシン (clindamycin) との併用による抗マラリア薬 Fosclin™ として、タイ及びガボンで第二相臨床試験に用いられている。

2. 研究の目的

これまで、大腸菌など数種の DXR の立体構造解析が報告されていたが、抗マラリア薬としてのホスミドマイシンの標的酵素である PfDXR の立体構造解析は報告されていなかった。我々は、松山大学薬学部の中西雅之准教授、岐阜大学工学部の北出幸夫教授らとの共同研究により、大腸菌で発現させた組換え型 PfDXR に関し、阻害剤フリーの 3 成分 (酵素・金属・補酵素) 複合体、阻害剤 (ホスミドマイシンおよびその類似体である FR900098) 結合型 4 成分 (酵素・金属・補酵素・阻害剤) 複合体の結晶化、立体構造解析に成功した (Umeda *et al.*, *Sci. Rep.*, 2011)。

一方、ホスミドマイシンには阻害活性が高いが脂溶性が低いため bioavailability が低いという欠点がある。そこで本研究では、より高い PfDXR 阻害活性を有しかつ脂溶性が高い新規化合物をデザインするため、ハイネリッヒハイネ大学デュッセルドルフの Thomas Kurz 教授との共同研究により、ホスミドマイシン類似体の 位に alkyl 側鎖を導入した新規阻害剤 3 種類 (図 1) と PfDXR との複合体の X 線結晶構造解析を行った (*J. Med. Chem.*, submitted)。

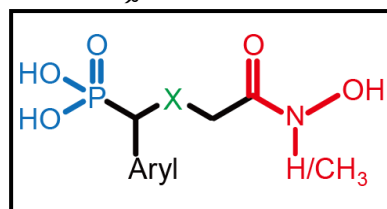


図 1 新規阻害剤の基本骨格 (X = O or CH<sub>2</sub>)

### 3. 研究の方法

大腸菌ホストとして BL21(DE3)、発現ベクターとして pQE30 を用いて発現させた組換え PfDXR に関し、金属アフィニティークロマトグラフィー (HisTrap HP カラム)、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 200pg カラム) の 2 段階で精製することにより、精製サンプルを得ることができた。ゲルろ過後の PfDXR を含むフラクションを回収し、遠心濃縮器 Centricon-30 を用いて 10 mg/ml まで濃縮した。精製サンプルの収量は、培地 1 L あたり約 0.5 mg 程度であった。

阻害剤を含む 4 成分 (酵素・補酵素・金属・阻害剤) 複合体結晶を調製するため、タンパク質溶液として 5 mg/ml PfDXR, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM NADPH, 2 mM 阻害剤, 2 mM DTT, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.8)、沈殿剤溶液として 20 % (w/v) PEG8000, 0.3 M Ca(OAc)<sub>2</sub>, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法により、約 1 週間で 0.02 x 0.02 x 0.1 mm<sup>3</sup> 程度大きさの柱状結晶が得られた。

得られた結晶を高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所 Photon Factory のビームライン 17A に持ち込み、回折強度データを収集し、ビームラインに設置されたワークステーション上でプログラム HKL2000 を用いたデータ処理を施すことにより、構造振幅データを得た。得られた構造振幅データを研究室に持ち帰り、その後の解析に用いた。

新規阻害剤複合体の位相決定には、ホスミドマイシン複合体の座標を用いた分子置換法を適用した。

### 4. 研究成果

Kurz 教授から提供された 15 種類の阻害剤に関し、12 種類の結晶化に成功し、そのうち 3 種類についてシンクロトロン放射光を用いることにより良好な X 線回折強度データを得ることができた。

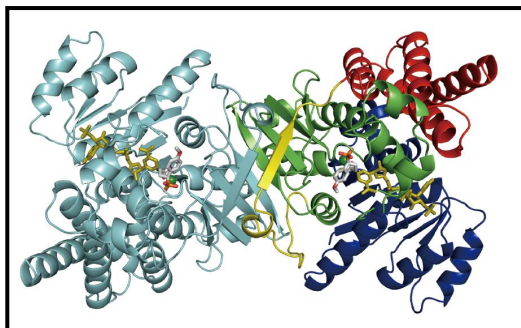


図 2 PfDXR の全体構造

PfDXR は、各サブユニットが 414 アミノ酸残基 (残基 75-488) からなるホモ 2 量体酵素である。各々のサブユニットは、補酵素結合ドメイン (残基 77-230)、触媒ドメイン (残基 231-369)、リンカー領域 (残基 370-395)、C 末ドメイン (残基 396-486) から成り、1 分

子ずつの NADPH、Mg<sup>2+</sup> イオン、阻害剤が結合していた (図 2)。阻害剤結合型 4 成分複合体のサブユニット構造を阻害剤非結合型 3 成分複合体の構造を比較してみると、阻害剤の結合により補酵素結合ドメインと触媒ドメインとの間にあるクレフトが閉じていることが明らかとなった。また、阻害剤非結合型 3 成分複合体ではディスオーダーしていた触媒ドメイン中の基質結合ループ (残基 291-299) が、阻害剤結合型 4 成分複合体においては明瞭な電子密度を示した。結晶学的に独立な 2 サブユニットのいずれにおいても同様の結果が観測されたことから、これらの構造変化は PfDXR の触媒反応において基質結合に伴い生じる構造変化を反映していると考えられる。このような阻害剤結合に伴う構造変化は、ホスミドマイシンとの複合体の場合にも観測されている。今回得られた 3 種類の新規阻害剤に関する複合体中における阻害剤の結合様式は、本質的には類似していた。以下にその中で最も高分解能のデータが得られた「阻害剤 X」に関し記述する。

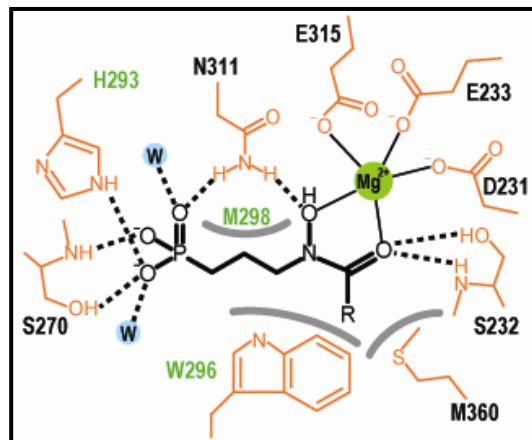


図 3 ホスミドマイシンの結合様式

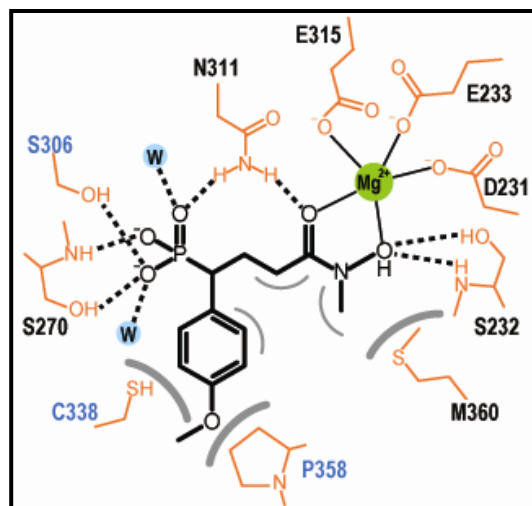


図 4 新規阻害剤 X の結合様式

阻害剤 X は触媒ドメインのクレフトに結合していた。阻害剤と PfDXR との相互作用に関しては、阻害剤分子中の 3 つの主た

る官能基（ホスホン酸基、メチレンスパーサー、逆ヒドロキサム酸基、位側鎖）毎に着目し以下に記述する。リン酸基アナログであるホスホン酸基は、Ser270, Ser306, Asn311 の側鎖、埋もれた水分子と水素結合ネットワークを形成していた。メチレンスパーサー部分は、Met298 と相互作用していた。逆ヒドロキサム酸基の2つの酸素原子は、完全なシス型で活性部位の Mg イオンに配位していた。酵素側の Mg イオン配位子は、Asp231, Glu233, Glu315 の側鎖であった。位芳香族側鎖部分は、Cys338 側鎖、Pro358 側鎖とファンデルワールス接触をしていた。

既に報告している PfDXR とホスミドマイシン ( $IC_{50} = 30 \text{ nM}$ ) との複合体における阻害剤の結合様式と今回得られた阻害剤 X ( $IC_{50} = 15 \text{ nM}$ ) の結合様式を比較してみると、ホスミドマイシン複合体の場合 (図 3) は、フレキシブルループ上に位置する Trp296 が阻害剤を認識していたが、阻害剤 X ( $IC_{50} = 15 \text{ nM}$ ) 複合体の場合 (図 4) は、サブユニットのコアに位置し自由度の少ない Cys338, Pro358 が阻害剤認識に関与していた。この違いが、新規阻害剤の強固な結合能に寄与していると考えられる。従って、位に芳香環を導入したタイプの阻害剤は、阻害能が高いというだけでなく脂溶性も高いため、新規抗マラリア薬のリード化合物として有望であると考えられる。また、メチレンスパーサー部分に関しては、酸素を導入するよりも、メチレンの方が周囲の疎水性環境と相性が良く有効であることが明らかとなった。

本研究で得られた知見に基づき、阻害剤 X を改良した新規化合物の合成が進められている。今後も PfDXR の構造生物学的研究を展開し、より強力かつ脂溶性の高い (ドラッグライクな) 化合物の開発に貢献したい。

## 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 3 件)

- (1) Konzuch, S., Umeda, T., Held, J., Hähn, S., Brücher, K., Lienau, C., Behrendt, C.T., Gräwert, T., Bacher, A., Illarionov, B., Fischer, M., Mordmüller, B., Tanaka, N., and Kurz, T. Binding modes of reverse fosmidomycin analogs towards the antimalarial target IspC *J. Med. Chem.*, submitted (2014).
- (2) 田中信忠, 梅田知伸, 日下部吉男, 中西雅之, 北出幸夫, 中村和郎  
「抗マラリア薬の開発を目指した構造生物学的研究」  
*薬学雑誌* **133**, 527-537 (2013).
- (3) 梅田知伸, 日下部吉男, 田中信忠  
「抗マラリア薬の開発を指向した熱帯熱

マラリア原虫由来ホスミドマイシン標的酵素の結晶構造解析」

*日本結晶学会誌* **54**, 107-112 (2012).

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 梅田知伸, 田中信忠, 日下部吉男, 中西雅之, 北出幸夫, 中村和郎  
Crystal structures of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) from *Plasmodium falciparum* complexed with inhibitors.  
第 11 回アジア結晶学会 (2012 年 12 月, アデレード)
- (2) 葉梨繁樹, 梅田知伸, 中西雅之, 北出幸夫, 田中信忠  
熱帯熱マラリア原虫由来非メバロン酸経路関連酵素に関する構造生物学的研究  
第 56 回日本薬学会関東支部大会 (2012 年 10 月, 東京)
- (3) 田中信忠, 梅田知伸, 日下部吉男, 中西雅之, 北出幸夫, 中村和郎  
抗マラリア薬の開発を目指した構造生物学的研究  
日本薬学会第 132 年会 (2012 年 3 月, 札幌)
- (4) Tanaka, N., Umeda, T., Kusakabe, Y., Nakanishi, M., Kitade, Y., & Nakamura, K.T. Structural basis of fosmidomycin's action on *Plasmodium falciparum*  
XXII congress and general assembly of the International Union of Crystallography (2011 年 8 月, マドリッド, スペイン)
- (5) 梅田知伸, 田中信忠, 日下部吉男, 中西雅之, 北出幸夫, 中村和郎  
ホスミドマイシン標的酵素の立体構造  
第 28 回 PF シンポジウム (2011 年 7 月, つくば)

〔その他〕

ホームページ等  
高エネルギー加速器研究機構・研究ハイライトにおける紹介記事  
「抗マラリア薬の開発を目指して」  
<http://www.kek.jp/ja/NewsRoom/Highlights/20110616131122/>  
(2011 年 6 月 16 日)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
田中 信忠 (TANAKA NOBUTADA)  
昭和大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 00286866