

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460508

研究課題名(和文) トランスシアリダーゼを標的としたシャーガス病治療薬の探索

研究課題名(英文) Screening of *T. cruzi* trans-sialidase inhibitors for a therapeutic agent of Chagas disease

研究代表者

上村 春樹 (UEMURA, Haruki)

長崎大学・熱帯医学研究所・講師

研究者番号：60184975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：トランスシアリダーゼ(TS)は、寄生性のトリパノソーマ原虫の一部にのみ検出される酵素で、シャーガス病の病原原虫 *Trypanosoma cruzi* においては、原虫のヒトへの感染に重要であることが示されている。東京大学創薬オープンイノベーションセンターの協力を得て行ったスクリーニングを基に有効な阻害剤を得ることが出来た。これまでTSに対する有効な阻害剤が見つかっておらず、その機能検証も困難であったが、この化合物を用いることで、感染におけるTSの役割を明らかにし、新しいシャーガス病治療薬開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* has been shown as an important key factor of *T. cruzi* in Chagas' disease. In this research, we have obtained some trans-sialidase inhibitor molecules from the first random screening of 9,600 core chemical compound library of open innovation center for drug discovery, The University of Tokyo, and further analysis of the derivatives based on the positive compounds at the first screening. No effective inhibitors enough for functional analysis have been reported yet and we are currently engaged in experiments with the new trans-sialidase inhibitors how trans-sialidase influences the parasite process of infection to and development in the host cells. We believe the inhibitor is a key for a new therapeutic agent of Chagas' disease.

研究分野：原虫の生化学

キーワード：トランスシアリダーゼ 阻害剤 シャーガス病 トリパノソーマ

### 1. 研究開始当初の背景

*Trypanosoma cruzi* はシアル酸を合成することが出来ない。しかし感染に際して、原虫表面のシアル酸が、宿主細胞との接着、侵入に重要であることが示され、この矛盾を説明する酵素としてトランスシアリダーゼは発見された。

トランスシアリダーゼは、寄生性のトリパノソーマ属原虫の一部のみに検出される特徴ある酵素で、ヒト等の宿主哺乳動物や媒介昆虫には存在しない。シャーガス病の病原原虫 *T. cruzi* においては、哺乳動物に感染した血流中でのトリポマスチゴ - ト stage で非常に高い活性が検出され、宿主由来の糖複合体の末端にあるシアル酸を切断して、原虫表面のガラクトース受容体に転移する活性を示す。トランスシアリダーゼ及びシアル酸を受取った分子は、原虫の宿主防御機構からの認識回避、免疫抑制、宿主細胞との接着、侵入等、原虫のヒトへの感染に重要であることが示されている。

また、シアル酸は種々の細胞認識、細胞間シグナル伝達やレセプターとして機能し、細胞機能の活性化あるいは抑制の引き金、コントロールを荷っていることが示されている。原虫から分泌されたトランスシアリダーゼが、様々な細胞に働きかけて、シャーガス病の急性期、慢性期の症状を引き起こす原因となっていることも示唆されている。しかし、トランスシアリダーゼに対する有効な阻害剤が見つかっておらず、活性を制御して役割を検証すること、それを基にして治療薬の開発へと進めることが出来ていない、というのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究は、東京大学創薬オープンイノベーションセンターの協力を得てトランスシアリダーゼ阻害剤のスクリーニングを行い、得られた化合物の有効性を示す事、さらに発展させてより阻害活性の高い治療薬開発のリード化合物を得ること、それらを用いてトランスシアリダーゼの役割を調べることを目的としている。

### 3. 研究の方法

遺伝子クローニングした *T. cruzi* トランスシアリダーゼを用いて、酵素活性を指標に阻害剤のスクリーニングを行った。阻害効果を示す化合物については、それらの阻害機構の解析と阻害係数の測定、生化学的な解析に用いた。

(1) トランスシアリダーゼの大腸菌での発現と精製：

既にクローニングしている *T. cruzi* トランスシアリダーゼファミリー遺伝子を用いた。その N 末端シグナル配列、C 末端リピートと GPI に置換される領域を除去した酵素活性に必要な領域を pET プラスミドに挿入、大腸菌 BL21(DE3) で発現させ、遺伝子の C 末端

部分に導入した His タグを利用しての Ni-NTA Superflow と、DEAE-Sepharose で精製した酵素標品を使用した。

(2) 酵素活性阻害を指標とした化合物ライブラリーのスクリーニング：

1 次スクリーニングには、蛍光ラベルしたシアル酸誘導体 2'-(4-methylumbelliferyl)-D-N-acetylneuraminic acid (4MU-NANA) を用いてシアリダーゼ活性の阻害を見た。従来 96 well plate を使用して 20  $\mu$ L で反応を行った後、200  $\mu$ L の 0.2M TrisHCl pH9.5 を加えて蛍光強度を測定していたが、1 次スクリーニングには 384 well plate を使用の方が効率的であり、それに合わせて 16  $\mu$ L で反応を行って 80  $\mu$ L の 0.5M TrisHCl pH9.5 を加えて測定した。さらに、阻害効果の認められた化合物については、トランスシアリダーゼが酵素として働いている環境である中性と酸性条件 (pH7.2 と 5.0)、トランスシアリダーゼ活性の受容体である Lactose の存在下と非存在下での阻害活性を調べた。

(3) 蛍光基質を用いたトランスシアリダーゼ活性の測定：

阻害効果を示した化合物を 2 次スクリーニングに用い、シアル酸を転移する活性への影響を調べた。従来アイソトープを使用していたトランスシアリダーゼのシアル酸転移活性の測定を、蛍光ラベルした基質を使用して行った。Sialyllactose をシアル酸供与体、4MU 標識した Galactose をシアル酸受容体として反応を行い、シアル酸を受け取った 4MU-Gal を QAE-Sepharose で trap、酸性条件下で溶出した後で加熱して 4MU と Gal の結合を切断し、シアル酸を受け取った 4MU-Gal を 4MU の蛍光として定量した。

Sialyllactose + Gal-4MU  
Trans-sialidase  
Lactose + Sial-Gal-4MU  
QAE-Sepharose  
trapped, elution,  
[Sialyllactose, Sial-Gal-4MU]  
acid treatment  
Measure free 4MU

### 4. 研究成果

(1) 東京大学創薬オープンイノベーションセンターの 9600 コア化合物を用いた 1 次スクリーニング：

大腸菌で発現、精製した *T. cruzi* トランスシアリダーゼを用いて、蛍光ラベルしたシアル酸誘導体 4MU-NANA の分解、シアリダーゼ活性を指標にして 9600 コア化合物を調べた。スクリーニングは 10  $\mu$ M で行い、バックグラウンドとコントロールの測定値から、プレート毎の S/B、CV、Z' を算出して、Z' 値が 0.5 以下と測定値のバラつきの大きかった 1 プレートについては再度測定を行った。

多少なりとも阻害効果の求められた化合物、30% 以上の阻害が認められた化合物が

220(2.2%)、そのうち約 100 の化合物(1%程度)が 50%以上の阻害、32 の化合物(0.3%)では 80%以上の阻害を示した。これら 30%以上の阻害を示した化合物について再度 10  $\mu\text{M}$  で活性阻害実験を行って、50%以上の阻害効果を示した 24 化合物を濃度依存性阻害実験に使用した。

4 度の濃度依存性阻害実験の結果、9 化合物で安定して 70%以上の酵素活性阻害が認められ、5 化合物については 90%程度の阻害が得られた。そのうち 2 化合物については、2.5  $\mu\text{M}$  で 70%以上、0.625  $\mu\text{M}$  でも 50%程度の阻害を示した。この結果を基にして、70%以上の酵素活性阻害が認められた 9 化合物を含む 50%以上の阻害を示した 13 化合物の構造公開と、それら化合物の関連誘導体の提供を東京大学創薬オープンイノベーションセンターに要求した。

(2) 1 次スクリーニングで阻害効果の認められた化合物とそれらの類似化合物による阻害効果の確認と検索：

9600 コア化合物を用いた 1 次スクリーニングで阻害効果の認められた 13 候補化合物とその類似体である 77 化合物を使用して、確認を含めてより有効な阻害化合物のスクリーニングを行った。阻害活性の測定において、各々の化合物における阻害の強さの傾向は保たれているのであるが、阻害の割合については測定値にバラツキが認められ何度かの実験を行って阻害を示す化合物を検索した。また、これら化合物をスクリーニングするにあたっては、シアル酸受容体である Lactose の存在がシアル酸切断の過程に影響を与えるか否か、トランスシアリダーゼが酵素として働いている環境である中性 pH7.2 と酸性条件 pH5.0 とで阻害の強さに違いが認められるか否か、についても調べた。

10  $\mu\text{M}$  で安定して 70%以上の阻害効果を示した化合物が 8 種類、そのうち 6 化合物では 90%以上の阻害活性、2.5  $\mu\text{M}$  でも 50%以上の阻害が認められた。それらの 3 化合物は 1 次スクリーニングで強い阻害効果の認められた化合物であった。

大部分の化合物においては、Lactose の存在がシアル酸を切断する反応に影響を与えなかったが、一部化合物で阻害が弱くなる場合が認められた。トランスシアリダーゼは、最初 4 MU-NANA あるいは Sialyllactose 等のシアル酸供与体のシアル酸と結合し、その後受容体の Lactose にシアル酸を渡すか、受容体の非存在下では水にシアル酸を渡す。この時、シアル酸を結合している状態と結合していない状態で酵素の立体構造が異なることが示されており、Lactose の存在が化合物の阻害効果を弱くすることは、酵素が Lactose と結合する状態において、その化合物と酵素の結合が妨げられて阻害がかかりにくくなることを示唆している。Lactose の存在が阻害活性に影響を与える化合物と与えない化合物で、トランスシアリダーゼの推測される

種々の機能における影響を比較して、シアル酸を切断することが重要なのか、シアル酸を受け渡すことが重要であるのか、区別して調べることが可能になると期待される。

また、ほとんどの化合物で阻害効果に pH の影響は認められなかったが、一部の化合物で酸性条件 pH5.0 では阻害が低くなる傾向を示した。その化合物には解離基が存在し、pH によって解離、電荷の状態が異なることが酵素との結合に影響し、阻害のかかり方に影響を与えたものと考えられる。

(3) 阻害剤効果を示す化合物の構造と活性の相関：

1 次スクリーニングで阻害効果の認められた化合物とその類似化合物、合計 90 化合物から 10  $\mu\text{M}$  で 90%以上の阻害を示す 5 化合物を得た。2 化合物は 1 次スクリーニングで強い阻害の認められた化合物、3 化合物は周辺化合物から得られたものである。1 次スクリーニングで阻害効果の認められた化合物の類似化合物を各々 6~8 化合物調べているが、必ずしもそれら類似化合物に阻害活性が認められるわけではない。阻害効果を示した化合物は全体としての構造は異なっているが部分的な類似性が認められ、酵素との相互作用が非特異的な結合ではないことが推測される。非常に類似した構造をしていても側鎖末端のメチレン基が一つ長くなったり短くなったりするだけで阻害効果を失う例が幾つか認められ、さらに詳細に置換基の影響を見ていく必要があることが示された。

阻害効果が認められた化合物について、タンパク質と低分子化合物との結合を検出することの出来る Protein Thermal Shift Assay を行った。高濃度の Sucrose の存在下では変化を認められなかったが、Lactose の存在下では 0.6 程度の  $T_m$  値の shift を伴う蛍光強度の変化が観測された。90%以上の阻害がかかる 10  $\mu\text{M}$  の阻害剤化合物の存在下では変化をほとんど検出することが出来なかったが、一部の阻害化合物では、40  $\mu\text{M}$  の濃度で  $T_m$  値は shift しないが蛍光強度の変化が認められた。トランスシアリダーゼと阻害化合物の結合はそれほど強くない全体としての構造変化を検出することは困難であることが示された。

(4) 培養液中の低分子化合物による阻害剤の効果への影響：

トリパノソーマ原虫の宿主細胞侵入におけるトランスシアリダーゼの役割を調べるにあたって、原虫から培地中に分泌されるトランスシアリダーゼに対する影響を調べたが、全く阻害が認められず、培養液中に含まれる何かが妨害していることが示唆された。酵素活性を測定する条件下で 95%以上の阻害がかかる濃度、スクリーニングで得られた化合物については 10  $\mu\text{M}$ 、従来から時々使用されているシアル酸誘導体 2-Deoxy-2,3-dehydro-n-acetyl-neuraminic acid (DANA) については 16mM で使用したが、2~5%を超

える阻害は検出することが出来なかった。阻害剤の効果を打ち消す作用は、血清を除去した培地のみでも認められ、アミノ酸、ビタミン等の低分子の組成の一部によるものと思われる。

10  $\mu$ M で 90% 以上の阻害効果を示す 5 化合物について、シアル酸を切断するシアリダーゼ反応とシアル酸を受容体に転移するトランスシアリダーゼ反応に対する阻害活性の比較、両方の活性に対する培地成分の影響を調べた。阻害剤非存在下では、培地が存在するとシアリダーゼ反応、トランスシアリダーゼ反応ともに数倍高い測定値が得られ、培地中に酵素を活性化する成分が存在することが示唆された。阻害剤 5 化合物は、シアリダーゼ反応とトランスシアリダーゼ反応に対する阻害効果、培地成分が共存することによる阻害の減弱について、相対的に類似した応答を示し、酵素に対して同じ部位に作用していることが推測された。強い阻害効果を示した化合物を用いることで、活性測定中に相対容量として 1/4 の培地成分が共存しても、2  $\mu$ M の濃度で酵素活性を 90% 以上阻害することが出来ることがわかった。これは、実験条件を検討すれば、原虫の宿主細胞への侵入過程においてトランスシアリダーゼの活性を阻害して侵入への影響を調べることが可能であることを示している。

トリパノソーマ原虫の培養液中に阻害剤の効果を妨害する成分が存在することは、それら成分の存在下でも酵素活性を阻害することの出来るさらに有効な化合物の開発が必要であることを示している。しかし、これまで細胞レベルでトランスシアリダーゼの機能を阻害することが出来なかったことを考慮すると、培養実験に使用することの出来る阻害化合物を見つけることが出来たことは有益なことである。トリパノソーマ原虫の宿主細胞への侵入、侵入後の原虫の増殖、原虫が分泌するトランスシアリダーゼによる宿主の様々な細胞機能の変化と病態への関与等、トランスシアリダーゼが関わっていることが推測されている各々の現象を、阻害剤を使用してより明らかにし、現在待たれているシャーガス病の有効な治療薬の開発へと進めたいと考えている。

#### 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 1 件)

- ① Hashimoto, M., J. Morales, H. Uemura, K. Mikoshiba and T. Nara (2015). "A Novel Method for Inducing Amastigote-To-Trypomastigote Transformation In Vitro in *Trypanosoma cruzi* Reveals the Importance of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor."

PLoS One 10(8): e0135726. 査読有、DOI: 10.1371/journal.pone.0135726

〔学会発表〕(計 1 件)

- ① 上村春樹, *Trypanosoma cruzi* トランスシアリダーゼ: 宿主細胞感染とシャーガス病の病態への関与、第 34 回日本糖質学会年会、平成 27 年 8 月 1 日、東京大学(東京都)

〔その他〕

ホームページ等

長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/nekken/research/protozoology.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 春樹 (UEMURA, Haruki)

長崎大学・熱帯医学研究所・講師

研究者番号: 60184975