

審査の結果の要旨

氏名 二橋 望

本研究は熱帯寄生虫症治療薬の開発を目的として、トリパノソーマ科原虫症に対する新規薬剤標的としてミトコンドリア呼吸鎖複合体 II に着目し、トリパノソーマ科原虫 *Leishmania tarentolae* を用いた薬剤標的酵素の大量調製と精製、そして阻害剤スクリーニングを行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. 先行研究 (Morales et al., 2009, JBC) において病原性トリパノソーマ科原虫 *Trypanosoma cruzi* を用いた呼吸鎖複合体 II の生化学的解析が行われ、原虫と宿主で酵素のサブユニット構造が大きく異なることが分かっていた。しかし、この時ミトコンドリアおよび酵素の大量精製が困難であることが判明していたため、本研究では非病原性のトリパノソーマ科原虫 *L. tarentolae* に着目して酵素のミトコンドリアの大量調製を行い、イオン交換カラム EDM Fractogel DEAE を用いた寄生虫呼吸鎖複合体 II の精製を行った。その結果、寄生虫液体培地あたりのミトコンドリア収量が先行研究の 14 倍、最終的な精製酵素収率が 16 倍 (0.19 mg/10 L 培地 → 3.2 mg/10 L 培地) となり、効率的な阻害剤スクリーニングやミリグラム単位の精製標品が必要な X 線結晶構造解析を行うことが可能になった。
2. 精製標品を用いて *L. tarentolae* 呼吸鎖複合体 II サブユニット解析を行った結果、*T. cruzi* の場合と同様に 12 本のバンドがゲル電気泳動で化学量論的に染色され、LC-MS/MS 解析によって疎水性サブユニット 3 つを除く SDH1-8 までの 9 つの *T. cruzi* 複合体 II サブユニットオルソログが検出された。このことから、今回モデルとして用いた *L. tarentolae* 呼吸鎖複合体 II (LtSQR) も *T. cruzi* と同様に 12 サブユニットをもち、哺乳類宿主の呼吸鎖複合体 II (4 サブユニット) と大きく異なる構造を有する可能性が示された。
3. マイクロプレートリーダーによる酵素活性測定を行い、*L. tarentolae* と病原性トリパノソーマ科原虫 *T. cruzi*、*Leishmania donovani*、*Trypanosoma brucei brucei* との間でマロン酸、カルボキシン、TTFA、アトペニン A5 の 4 種の哺乳類呼吸鎖複合体阻害剤の感受性を IC₅₀ により比較した。4 トリパノソーマ科原虫の呼吸鎖複合体 II はカルボキシンおよび TTFA に 100 μM 濃度でも感受性を示さず、哺乳類酵素の nM オーダー阻害剤アトペニン A5 にも IC₅₀ = 6.5~13.1 μM の低い感受性を示した。化合物全てにおいて LtSQR への IC₅₀ は病原性トリパノソーマ科原虫の 0.7~2.1 倍の範囲にあることから、この酵素がサブユニットレベルだけでなく阻害剤感受性でも他のトリパノソーマ科原虫のモデルとなり得ることが示された。

4. LtSQR を用いて 10 種の呼吸鎖複合体酵素阻害剤と代表的なトリパノソーマ科原虫症治療薬ニフロチモックスについて酵素活性阻害測定を行った所、真菌呼吸鎖複合体 II 阻害剤であり大型哺乳類 SQR への阻害効果を示さないことが知られていた化合物シッカニンで $IC_{50}=290$ nM の阻害効果が示された。このシッカニンは *L. tarentolae* ミトコンドリアに存在するグリセロール三リン酸脱水素酵素、NADH-キノン酸化還元酵素、キノールシトクローム c 酸化還元酵素といったキノンを経る酵素を 50 μ M で阻害しなかった。またラインウェーバー・バークプロットによる酵素学的解析の結果、シッカニンは LtSQR に対して基質存在下でも阻害効果を維持する阻害様式の混合阻害を示し、キノン飽和下における酵素活性 99 % 阻害濃度は約 10 μ M であった。このシッカニンは *T. b. brucei*、*T. cruzi*、*L. donovani* の呼吸鎖複合体 II 活性を LtSQR に対する場合と同等の IC_{50} で阻害し、かつ *T. b. brucei*、*T. cruzi*、*L. donovani* および *Leishmania major* (リーシュマニア症病原体) の虫体レベルでの増殖を *in vitro* で阻害した(それぞれ $IC_{50}=8.3$ μ M、 10 μ M、 0.7 μ M、 13 μ M)。この結果は LtSQR を用いた本スクリーニング系が今後病原性トリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II の阻害剤を探索する上で有用である事を示すとともに、呼吸鎖複合体 II 阻害剤がトリパノソーマ症治療薬の標的として有望である可能性を初めて示した。しかし本研究では動物実験などの *in vivo* による評価を行っておらず、薬剤としての実用化にはヒト細胞への副作用などを今後検証する必要がある。
5. 呼吸鎖複合体 II はトリパノソーマ科原虫症と感染地域が重複する熱帯寄生虫症である寄生性線虫症において重要な薬剤標的であり、かつシッカニンは線虫に対する発達阻害効果を示すことが知られていたことから、この化合物が寄生性線虫症に対する治療薬候補となり得るかを調べるため、モデル生物であるブタ回虫 *Ascaris suum* の精製呼吸鎖複合体 II を用いたシッカニンの酵素活性阻害測定を行った。その結果、シッカニンは *A. suum* 呼吸鎖複合体 II を 5.7 nM の IC_{50} で阻害し、LtSQR の場合と同様に混合阻害様式を示した。一方、RPMI1640 液体培地中で 100 μ M のシッカニン存在下で成虫ブタ回虫を *in vitro* 培養した所、DMSO コントロールに比べて生存時間に顕著な差が見られなかった。この結果は、シッカニンの虫体そのものへの効果が酵素活性阻害実験から予想されるよりも低いことを示している。

以上、本論文は熱帯感染症であるトリパノソーマ科原虫症において潜在的な薬剤標的であった呼吸鎖複合体 II の大量調製法を非病原性のモデル生物 *L. tarentolae* を用いることで構築し、これまで困難であった酵素の大規模な阻害剤スクリーニングや X 線結晶構造解析への可能性を開いた。本研究を通じて見出された初の原虫呼吸鎖複合体 II 選択的阻害剤シッカニンは、トリパノソーマ科原虫に対して *in vitro* で増殖阻害効果を表し、呼吸鎖複合体 II が有望な薬剤標的であることを初めて示した。本研究はトリパノソーマ症治療薬開発における新たな薬剤標的の選択肢を増やすと共に、今後より大規模な阻害剤スクリーニング

や標的酵素の立体構造解析を行うための有用な手段を提供すると考えられ、学位の授与に値すると考えられる。