

博士論文

論文題目 熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系
を標的とした新規薬剤の開発

氏名 小松谷 啓介

熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系を
標的とした新規薬剤の開発

医学系研究科 国際保健学専攻 生物医化学教室
指導教員 北 潔
小松谷 啓介

要旨

マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系は有望な薬剤標的である。複合体 II の遺伝子破壊は赤内型で増殖遅延、蚊体内の原虫に対し致死的であり、複合体 III は抗マラリア薬であるアトバコンの標的であることが報告された。この様に複合体 II と複合体 III はマラリアの制圧のための格好の薬剤標的である。

私はこの 2 つの酵素に対する阻害剤シッカニンを見出した。シッカニンは複合体 II を nM オーダーで、複合体 III を μM オーダーで阻害した。さらに、熱帯熱マラリア原虫の増殖も阻害した。

これらの結果より、シッカニンはマラリア患者の治療薬およびマラリア伝播阻止薬として有望な阻害剤であり、マラリア原虫の複合体 II を阻害する初めての阻害剤であることを見出した。

略語

ABS	Absorbance
ADP	Adenosine diphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
DCIP	2,6-dichloroindophenol
DHO	Dihydroorotate
DHODH	Dihydroorotate dehydrogenase
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EFT	Electron transfer flavoprotein
G3P	Glycerol-3-phosphate
IC ₅₀	50% inhibitory concentration
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAD ⁺	Oxidized nicotinamide dinucleotide
NBF	Nitroblue formazan
NBT	Nitroblue tetrazolium chloride
P5C	(S)-1-pyrroline-5-carboxylate

Pi	Inorganic phosphate
PIPES	Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
Q	Ubiquinone
QH ₂	Ubiquinol
RNA	Ribonucleic acid
TCA	Tricarboxylic acid
TTFA	Thenoyltrifluoroacetone

1. 序章

1-1. マラリア

マラリアは *Plasmodium* 属のマラリア原虫により引き起こされる寄生虫症で、World Malaria Report 2015 によると、2014 年のマラリア感染者は 2 億 1,400 万人、死者は 483,000 人と推定されているが、実際の数字ははるかに高い。また、マラリアによる死者のほとんどはアフリカの 5 歳以下の子供たちである(1)(図 1)。ヒトに寄生するマラリア原虫は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*)と卵形マラリア原虫(*P. ovale*)の 4 種である。この中で最も重篤な症状を引き起こすのが、熱帯熱マラリア原虫である。近年サルマラリア原虫の一種である *P. knowlesi* のヒトへの感染が報告され、第 5 のヒトマラリアとして提唱されている(2)。

マラリアの治療は、有効なワクチンが未だに開発されておらず化学療法に依存している。現在の治療法はアルテミシニンまたはその誘導体と薬剤標的が異なり半減期の長い抗マラリア薬との組み合わせであるアルテミシニン併用療法 (Artemisinin Combination Therapies : ACT) が主流となっている。しかし、東南アジアのカンボジア、ミャンマー、ラオス、タイ、ベトナムでアルテミシニンに対する薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の出現が報告され、特にカンボジアとタイ

の国境付近ではアルテミシン耐性に加え、多剤耐性熱帯熱マラリア原虫が蔓延している(3)。既存の抗マラリア薬とは作用機序が異なる新規抗マラリア薬の開発が急務となっている。

1-2.マラリア原虫の生活環

マラリア原虫は *Anopheles* 属のハマダラカによりヒトへと媒介される。マラリア原虫を保有するハマダラカの吸血時に、唾液と共にヒト体内にスポロゾイトが侵入する。数分以内にスポロゾイトは血流によって肝臓に運ばれ、肝細胞に侵入する。肝細胞内でシゾゴニーにより数千から数万個のメロゾイトを形成する。そして、肝細胞を破壊して血流にメロゾイトを放出する。次にメロゾイトは赤血球に侵入し、赤血球内で無性生殖を行いリング、トロホゾイト、シizontを経て赤血球を破壊しメロゾイトを放出して、これがまた次の未感染赤血球に侵入する。この時期の原虫は赤内型と呼ばれ、ヒトに重篤なマラリア症状を引き起こすため、薬剤による治療の対象となっている。赤内型の一部の原虫は有性生殖世代であるミクロガメトサイト(雄)および、マクロガメトサイト(雌)へと分化する。雌雄のガメトサイトがハマダラカの吸血時に体内に取り込まれることでガメトへと分化する。ミクロガメトサイトは鞭毛を放出して、運動能を持つ 8 個のガ

メートへ分化する。受精した雌性のガメートはザイゴートとなり、ザイゴートはオーキネートへと分化する。運動性を持ったオーキネートは蚊の中腸上皮細胞を通過し、その基底膜上でオーシストを形成する。オーシスト内でスポロゾイトが形成され、放出されたスポロゾイトは唾液腺に移動して、吸血時に再びヒト体内に侵入して、新たな感染が成立する(図 2)。この様に複雑な生活環を持つために、マラリアの制圧は困難を極めている。現在、マラリア制圧に向けて、症状を引き起こす赤内型ステージのみならず、マラリアの伝播に非常に重要なガメトサイトまたは、蚊体内のステージを標的とする伝播阻止薬及びワクチンの必要性が提唱されている(4)。さらに、三日熱マラリア原虫は肝細胞内で休眠体(ヒプトゾイト)を形成し、再燃を引き起こす。このため、再燃防止のため肝細胞内の原虫にも効果がある抗マラリア薬の開発も必要とされている。

現在、新規抗マラリア薬に必要とされている特性は、「併用療法の選択可能」、「血中期における、解熱を目的とした単回投与・長時間作用型の分子製剤」、「肝内期における、感染及び再発防止薬」、「配偶子を死滅させ、伝播を阻止する分子製剤」の 4 つである(1)。

1-3.マラリア原虫のミトコンドリア

赤内型のマラリア原虫のミトコンドリアは1原虫当たり1つ観察される。他の生物同様に独自のゲノムを所有しているが、サイズは6 kbp と非常に小さく今まで報告されているミトコンドリアゲノムの中では最小である(5)。さらに、赤内型の原虫ではミトコンドリアはクリステ構造が発達していないが(6)、有性生殖世代であるガメトサイトでは発達したクリステ構造が観察されている(7)。一般的に、ミトコンドリアはTCA回路と電子伝達系及びATP合成酵素によるATP産生の場合、赤内型のマラリア原虫の場合、ATP合成は解糖系に依存していることが明らかとなっている(8)。そのため、マラリア原虫のミトコンドリアの機能及び生理的役割の全容はまだ明らかになっていない。

1-4.マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系

寄生虫のエネルギー代謝は多様性に富み、宿主と異なることから有望な薬剤標的と考えられている(9, 10)。宿主であるヒトの電子伝達系は複数のユビキノ還元酵素、すなわち複合体I(NADH-ubiquinone reductase)(11)、複合体II(succinate-ubiquinone reductase : SQR)(12)、Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)(13)、

glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)(14) 、 electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETFDH)(15) 、 proline dehydrogenase (PRODH)(16)、 sulfide:quinone oxidoreductase (SQOR)(17)をから構成されている。これら酵素は電子をユビキノンプール(Q-プール)に伝達する(図 3A)。一方、マラリア原虫のユビキノン還元酵素は 2 型 NADH dehydrogenase (NDH2)とヒトのゲノムには存在しない malate-quinone oxidoreductase (MQO)、構造と生化学的特性が大きく異なった複合体 II、DHODH、さらにマラリア原虫内で機能が未だに明らかにされていない G3PDH から構成されている(18, 19)。これら酵素により取り出された電子は複合体 III (cytochrome *bc*₁ complex)と cytochrome *c*、複合体 IV (cytochrome *c* oxidase)を介して、最終的に酸素に受け渡される(図 3B)。複合体 I、複合体 III と複合体 IV によって生じたプロトン濃度勾配(マラリア原虫の場合は複合体 III と複合体 IV)を利用し複合体 V (F₀F₁ ATP synthase)が ATP を合成する。ミトコンドリア呼吸鎖複合体は全て膜貫通タンパク質であり、複数のサブユニットから構成されるが、複合体 II を除くユビキノン還元酵素群は全てシングルサブユニットのタンパク質である。

1-4-1.DHODH (Dihydroorotate dehydrogenase)

赤内型でのマラリア原虫のミトコンドリア呼吸鎖の薬剤標的は DHODH と複合体 III であり(20, 21)、この呼吸鎖は両酵素が関与するピリミジン生合成のためのみに必須であると報告された(22)。マラリア原虫は宿主であるヒトとは異なり、ピリミジンサルベージ経路に関する遺伝子を欠損しており、DNA と RNA に必要なピリミジンは *de novo* の生合成に依存している(18, 23)。マラリア原虫の DHODH はミトコンドリアの内膜に局在しており、ジヒドロオロト酸をオロト酸に変換し、ユビキノンに電子を受け渡すピリミジン生合成の 4 番目の反応を触媒する。その還元されたユビキノンであるユビキノールは複合体 III によって再酸化される(図 3 B)。このために、複合体 III はピリミジン生合成に関与し赤内型のマラリア原虫の増殖に必要不可欠であると考えられている。現在、臨床で使用されているアトバコンは複合体 III の cytochrome *b* を標的としている(24)。また、第二相試験まで進んでいる DSM265 は DHODH を標的としている(Clinical Trials.gov Identifier: NCT02123290)(25)。この様に、DHODH と複合体 III は新規抗マラリア薬の格好の薬剤標的である。

Lactococcus lactis、*Trypanosoma spp* と *Saccharomyces cereviceae* は可溶性の DHODH を持ち、ミトコンドリア電子伝達系への電子の授受は行われておらず、

ユビキノンの代わりにフマル酸を電子受容体としている(26, 27)。また、この可溶性 DHODH はミトコンドリア DHODH の阻害剤に対し非感受性である。この *S. cereviceae* の可溶性 DHODH (yeast DHODH) を熱帯熱マラリア原虫に発現すると、DHODH と複合体 III の阻害剤アトバコンに対し、感受性が低くなる(22)。この結果から、マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系は TCA 回路や ATP 産生ではなくピリミジン生合成のみに必須であると結論付けられた。

1-4-2.MQO (Malate-quinone oxidoreductase)

2015 年にユビキノン還元酵素の 1 つである MQO と TCA 回路の酵素である fumarate hydratase (FH) の遺伝子破壊により、これらの酵素が赤内型のマラリア原虫の生存増殖に必須であることが報告された(28)。MQO はリンゴ酸をオキサロ酢酸に変換し、その際の還元力をユビキノンの電子伝達系に伝達する。また FH はリンゴ酸をリンゴ酸に変換する反応を触媒する。これら二つの酵素は TCA 回路系の機能に関与しているが、その重要性は TCA 回路よりもリンゴ酸代謝に関わっていると考えられている(29)。マラリア原虫の遺伝子は DNA と RNA を合成するためのプリン生合成経路の酵素を欠損しており、宿主であるヒトからプリン前駆体を取り込むプリンサルベージ経路によってプリン塩基の生合成を行っている(30)。

その時にサイトゾルで産生されるフマル酸がミトコンドリアに移動して、FHによりリンゴ酸に変換し、次にこれがMQOによりオキサロ酢酸に変換される。オキサロ酢酸はミトコンドリアからサイトゾルに輸送され Aspartate aminotransferase によりアスパラギン酸に変換され、プリンサルベージ経路に取り込まれる。このフマル酸代謝のため赤内型のマラリア原虫のMQO、FHは生存に必須であると考えられている(28, 29)。また、マラリア原虫のMQOはミトコンドリア内膜に局在し、ミトコンドリア呼吸鎖に電子を伝達しているが、宿主であるヒトではリンゴ酸の還元系はミトコンドリアマトリックスに局在しており、電子受容体としてNAD⁺を利用する。この様にMQOは宿主であるヒトには存在せず、また赤内型のマラリア原虫の生存に重要なため格好の薬剤標的と考えられている。しかし、ミトコンドリアに局在するMQOに関する生化学解析は行われておらず、MQOに対する阻害剤も見出されていない。

1-4-3.複合体 III (cytochrome *bc*₁ complex)

複合体 III はミトコンドリアの電子伝達系において、中心的な役割を担いユビキノールを酸化してユビキノンに変換する反応を触媒し、キノールからの電子を cytochrome *c* に受け渡す働きを行う。その複合体 III の触媒部位は3つのサブユ

ニットである cytochrome *b*、cytochrome *c*₁、Rieske iron-sulfur protein ([2Fe2S], ISP) から構成されている。複合体 III は 2 つのキノン結合部位である Q_o 部位(Quinol oxidation site)と Q_i 部位 (Quinone binding site)を持つ。アンチマイシン A は Q_i 部位に結合し、スチグマテリンとミキソチアゾールは Q_o 部位に結合することで複合体 III の機能を阻害する(31, 32)。抗マラリア薬であるマラロンの主成分アトバコンは複合体 III の阻害剤で、Q_o 部位を構成する cytochrome *b* に結合して低濃度で複合体 III を阻害する(24, 33)。しかし、Q_o 部位はミトコンドリアゲノムにコードされており、遺伝子変異が起きやすく、アトバコンに対する薬剤耐性株が短期間で出現した(34)。そのため、アトバコンは単独投与ではなく、マラリア原虫の葉酸代謝に重要である Dihydrofolate reductase (HDHFR)の阻害剤であるプログアニルと併用で使用されている(35)。マラリア原虫の複合体 III は阻害剤の感受性が哺乳類の複合体 III と異なるため、有望な薬剤標的であり、現在、核ゲノムにコードされている遺伝子変異の頻度が低い Q_i 部位に対する阻害剤の研究が行われている(21)。

1-4-4.NDH2 (2 型 NADH dehydrogenase)

NDH2 はシングルサブユニットの酵素で、哺乳類のミトコンドリア複合体 I と同じ反応を触媒するがプロトンポンプの機能は持っておらず、複合体 I に特異的な阻害剤であるロテノンに対して感受性が低い(36)。マウスマラリア原虫である *P. berghei* において、NDH2 の遺伝子破壊株は、赤内型の原虫では生存可能であるが、蚊ステージでオーシスト形成ができなくなることが報告された(37)。このことから、NDH2 は昆虫ステージで必須であることが示された。一方、熱帯熱マラリア原虫の NDH2 に対する特異的な阻害剤である CK-2-68 (IC₅₀=16 nM) は熱帯熱マラリア原虫 3D7 株の増殖を低濃度(IC₅₀=31 nM)で阻害することが報告された(32, 38)。それに加え、NDH2 の特異的な阻害剤と複合体 III の阻害剤であるアトバコンを組み合わせ、熱帯熱マラリア原虫に対する阻害効果を検討すると、アトバコンの阻害効果が増大することが報告された(39)。これらの結果により、熱帯熱マラリア原虫の NDH2 は必要不可欠であると考えられたが、実際には CK-2-68 は複合体 III も阻害し(IC₅₀=500 nM)、yeast DHODH 発現マラリア原虫では CK-2-68 に対して感受性が低くなることから、標的は NDH2 に加えて、複合体 III であると報告されている(38)。以上の現状から、熱帯熱マラリア原虫の NDH2 の詳細な解析が必要とされている。

1-4-5.複合体 II (succinate-ubiquinone reductase :SQR)

ミトコンドリアの複合体 II は好氣的エネルギー代謝では TCA 回路と電子伝達系を結ぶ酵素でコハク酸からユビキノンに電子を受け渡し、フマル酸を生成する酵素である(40)。複合体 II の構成サブユニットは生物種によって大きく異なる。哺乳類の複合体 II は flavoprotein (Fp)、iron-sulfur cluster protein (Ip)、2 個の膜アンカーサブユニットである cytochrome *b* large (CybL)と small (CybS)の 4 個のサブユニットから構成されている(40)。それに対して、植物の複合体 II は 8 個のサブユニット、トリパノソーマでは 12 個のサブユニットから構成されている(41, 42)。当研究室の以前の研究によると、マウスマラリア原虫の *P. yoelii yoelii* は複合体 II のサブユニットは 4 個からなると示唆されたが(43)、マラリア原虫では膜アンカーサブユニットである CybL と CybS が他の生物種とアミノ酸配列が異なると考えられ、未だに同定されていない(44, 45)。当研究室が北里研究所との共同研究で発見した複合体 II の強力な阻害剤であるアトペニン A5 は哺乳類、蠕虫と細菌の複合体 II に対し非常に低い濃度で阻害するにも関わらず、マラリア原虫の複合体 II は、感受性が低い(46, 47)。さらに、マラリア原虫の複合体 II は既存の複合体 II の阻害剤(マロン酸、TTFA、カルボキシシン)に対しても感受性が低い(表 1)(43, 47)。TTFA、アトペニン A5 とカルボキシシンは、ユ

ビキノン結合部位に結合するため、マラリア原虫の複合体 II のユビキノン結合部位の構造が哺乳類または他の生物種と大きく異なることを示している。このために、マラリア原虫の複合体 II に対する特異的阻害剤は見出されていない。

熱帯熱マラリア原虫と *P. berghei* において、複合体 II の構成サブユニットである Fp サブユニットの遺伝子破壊の結果から、赤内型では生存に必須ではないことが明らかとなった(48, 49)。一方、蚊体内のステージでは *P. berghei* の複合体 II 遺伝子破壊による明確な影響が観察され、オーシスト形成ができなくなることが明らかとなった (48)。この結果から、複合体 II は蚊体内のステージでは必須であるため、伝播阻止薬の薬剤標的と考えられている。

しかし、赤内型において、熱帯熱マラリア原虫と *P. berghei* の複合体 II の Fp サブユニットの遺伝子破壊株は増殖遅延を引き起こした。その増殖遅延は、基質であるコハク酸の添加によって回復することが明らかとなった(49)。フマル酸では増殖遅延が回復しなかったことから、赤内型では succinate-ubiquinone reductase(SQR)ではなく quinol-fumarate reductase (QFR)として機能していると考えられた(図 4)。さらに、熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア画分を用いた研究によると dihydroorotate の添加による酸素消費は観察されたが(DHODH – ubiquinone – Complex III – cytochrome *c* –Complex IV の複合活性)、コハク酸の添加による酸素消費は見られなかった(Complex II – ubiquinone – Complex

III – cytochrome *c* – Complex IV の複合活性)。それに加え、DHODH による酸素消費はフマル酸によって阻害されることが明らかとなり、ミトコンドリア呼吸鎖においても、複合体 II は SQR ではなく QFR として機能していると考えられた(50)。これら二つの報告により、赤内型のマラリア原虫において複合体 II が QFR として機能していることが示された。それに加え、熱帯熱マラリア原虫の ATP 合成は *in vitro* 培養では解糖系に依存していると考えられているが、Daily らが、マラリア患者由来の熱帯熱マラリア原虫の遺伝子発現解析を行ったところ、発現パターンが *in vitro* 培養と同様に解糖系に依存した発現パターンと TCA 回路、電子伝達系に依存した発現パターンが得られた(51)。この報告によりヒト体内の熱帯熱マラリア原虫は、*in vitro* 培養の熱帯熱マラリア原虫とエネルギー代謝が異なり、TCA 回路とミトコンドリア電子伝達系を直接つなぐ複合体 II の機能がヒト体内では重要な役割を担っていると考えられている。しかし、*in vitro* と *in vivo* における複合体 II の生理的意義について明確な結論は未だに得られていない。

1-5. シッカニン

本研究の目的は、マラリア原虫の複合体 II 特異的な阻害剤を探索して、ケミ

カルバイオロジーによるアプローチにより、複合体 II の機能と生理的意義を明らかにすること、また複合体 II を標的とした新規抗マラリア薬および新規マラリア伝播阻止薬の開発である。そこで、着目した化合物がシッカニンである。シッカニンは *Helminthosporium siccans* から単離された化合物で、真菌の複合体 II を阻害し、すでに臨床では足白癬の治療薬として使用されていた(図 5)(52)。

当研究室の結果から、シッカニンは真菌である *Trichophyton mentagrophyte* や緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の複合体 II を nM オーダーで阻害するが、ブタのミトコンドリアや大腸菌 *Escherichia coli* の複合体 II は阻害しない、種特異的な阻害剤であることが判っている(表 2)。さらに、シッカニンはアトペニン A5 に対し 300 倍高い IC₅₀ を示し感受性の低い *Leishmania tarentolae* の複合体 II を 0.19 μM で阻害することが明らかとなっている(二橋 望,2015 年,博士論文)。また、そのシッカニンの阻害機構は複合体 II のキノン結合部位に結合することでユビキノンに対して競合阻害を示すことが明らかとなっている(53)。これらの理由により、シッカニンが熱帯熱マラリア原虫の複合体 II の活性を阻害する可能性があると考えた。そこで、このシッカニンによる熱帯熱マラリア原虫の複合体 II の阻害について検討した。

2.材料と方法

2-1.化合物及び試薬

シ ッ カ ニ ン ((1S,4R,12S,15Sm20R)-8,16,16-tremethyl-3,11-dioxapentacyclo[10.7.1.0^{1,15}.0^{4,20}.0^{5,10}] icosa-5,7,9-trien-6-ol) とシッカニン誘導体 (SD1、SD2、SD3、SD4、SD5 と SD6)は第一三共株式会社から供与された(図5)。アトバコンは USP PROCVILLE and ICN Biomedical Inc.から購入した。その他の試薬は、記述がない限りシグマ・アルドリッチから購入した。

2-2.熱帯熱マラリア原虫の培養

Trager と Jensen らの方法に従い、熱帯熱マラリア原虫 3D7 株、K1(クロロキン耐性)株と Dd2(多剤耐性)株を培養した(54)。培地は RPMI1640 培地 (Invitrogen)に終濃度 25 mM NaHCO₃、10 mg/l hypoxanthine、25 mg/l gentamicin sulfate、ヘマトクリット値 3% A 型ヒト赤血球と 0.5% (w/v) Albumax II (Invitrogen) を添加し、これを完全培地として培養に使用した。培養はマルチガスインキュベーターMG-70M(Taitec)、37°C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂ 下で行った。培地は毎日、新しい培地に交換した。感染率(Parasitemia)(%)の測定はギムザ染色による薄

層標本にて光学顕微鏡下で行った。

複合体 II の flavoprotein (Fp) subunit (Δ pfsdh) 遺伝子破壊株とコントロールとして Fp 遺伝子の全長配列を組み込んだ熱帯熱マラリア原虫(full-length)株は選択マーカーとして、human DHFR を持つため完全培地にマラリア原虫の DHFR を阻害する WR99210 (Jacobus Pharmaceuticals)を終濃度 5 nM 加えて、培養した。実験で使用した赤血球は日本赤十字社から譲渡された A 型ヒト赤血球を使用し、東京大学医学部倫理委員会の承認を得て実験を行った(No. 10050)。

熱帯熱マラリア原虫の同調培養は、5 % (w/v) ソルビトール処理、10 分間行った(55)。

2-3. N₂ cavitation 法による粗ミトコンドリア画分の調製

N₂ cavitation 法は Takashima らの方法に従った(50)。5 % (w/v) D (-) ソルビトール処理を行った熱帯熱マラリア原虫 3D7 株を培養液 600 ml で 64 時間培養しトロホゾイトステージに同調させた。感染赤血球を 800×g、5 分、4 °C で回収した。感染赤血球を AIM buffer [120 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM PIPES, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose; pH6.7] で洗浄後、0.075 % (w/v) サポニン/AIM、室温で 5 分反応させ溶血させた。原虫を 5,800×g、4 °C、10 分で遠心し回収したのち、AIM

buffer で 3 回、2780×g、7 分、4 °C で遠心し、洗浄した。原虫を 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)を含む MSE buffer (225 mM manitol、75 mM sucrose、0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、3 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane-HCl;pH7.4)に懸濁した。細胞破碎は N₂ cavitation 法により行った。4639 Cell Disruption Bomb (Parr, USA)を用い 1,200 psi、20 分、4 °C、N₂ガス下で静置した後、急速に大気圧下に戻して細胞破碎を行った。800×g、5 分、4 °C で遠心し、未破壊細胞を取り除いた。上清は 5,000×g、20 分、4 °C で遠心し、遠心後の上清を取り除き、200-400 μl MSE buffer で懸濁しこれを粗ミトコンドリア画分とした。粗ミトコンドリア画分のタンパク質濃度は Bradford 法 [Bio-Rad protein assay kit Bio-Rad laboratories Inc. Japan] により求めた。検量線はウシ血清アルブミンを使用した。

2-4. 熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア呼吸鎖酵素の活性測定

SQR、DHODH、MQO、NDH2、G3PDH と dihydroorotate-cytochrome *c* (DHO-cyt *c*) reductase 活性は(43, 56)の方法に従い、分光光度計 V-660 spectrophotometer (JASCO) を使用し酵素活性を測定した。SQR 活性は 4.5 μM 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP)、100 μM ubiquinone-2 (UQ2)、2 mM KCN と 50 mM

potassium phosphate; pH8.0 の 1 ml 反応液中、25°Cで測定した。DHODH、MQO と G3PDH 活性は 4.5 μ M DCIP、100 μ M ubiquinone-2 (UQ2)、2 mM KCN と 30 mM Tris-HCl; pH8.0 の 1 ml 反応液中、25°Cで測定した。SQR、DHODH、MQO と G3PDH 活性はそれぞれの基質である終濃度 10 mM コハク酸ナトリウム、500 μ M L- dihydroorotate、10 mM リンゴ酸ナトリウムと 500 μ M glycerol-3-phosphate を加えた後、還元された DCIP の吸光度変化を波長 600 nm で測定した。

NDH2 活性は 100 μ M ubiquinone-1 (UQ1)、2 mM KCN と 50 mM potassium phosphate (pH8.0)の 1 ml 混合液を 25°Cで測定した。NDH2 活性は基質である終濃度 20 μ M NADH を添加後、NADH の吸光度変化を波長 340 nm で測定した。

DHO-cyt *c* 活性は DHODH と複合体 III の複合活性で、マラリア原虫の複合体 III の評価系に用いられる(33, 56)。DHO-cyt *c* 活性は 20 μ M cytochrome *c*、2 mM KCN と 30 mM Tris-HCl (pH8.0) の 1 ml 反応液中、25°Cで測定した。DHO-cyt *c* 活性は終濃度 500 μ M L-dihydroorotate を添加後、cytochrome *c* の還元を波長 550 nm で測定した(図 6)。DMSO に溶解した各濃度シッカニンと終濃度 10 μ M シッカニン誘導体を混合液に添加した。また、コントロールとして終濃度 0.1 % (v/v)DMSO を使用した。IC₅₀ は 4 係数ロジスティクス曲線により求め、解析ソフトは GraphPad Prism®ver.6.01(有限会社エムデーエフ)を使用した。

2-5.シッカニンの培養型熱帯熱マラリア原虫への影響の検討

感染率 2.0 %の 5 % (w/v) ソルビトール処理した熱帯熱マラリア原虫 3D7 株を 1 mL、24 ウェルプレートで培養した。培養液に終濃度 50 μ M シッカニンを加えて、16、24、36、48 時間ごとにギムザ染色により光学顕微鏡下で感染率を測定した。Control として終濃度 0.1 % (v/v) DMSO を使用した。

2-6.LDH アッセイによるシッカニンの抗マラリア活性の測定

感染率 0.3 %の 5 % (w/v) ソルビトール処理した熱帯熱マラリア原虫 3D7、K1、Dd2、 Δ pfsdh、full-length 株を 100 μ l、96 ウェルプレートを使用し、培養した。培養液に各濃度シッカニンと Negative control として、終濃度 0.2 % (v/v) DMSO、Positive control として終濃度 10 μ M クロロキンを添加した。熱帯熱マラリア原虫に対するシッカニンの阻害率 (%) (% inhibition) を Lactate dehydrogenase (LDH) アッセイにて算出した。培養 72 時間後、培養液に冷却した Phosphate buffered saline (PBS) を各ウェル当たり 200 μ l 加えた。1,300 \times g、10 分、4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清を各ウェル当たり 240 μ l ずつ取り除いた。その培養液を -30 $^{\circ}$ C のフリーザーに静置し、24 時間後、室温に戻して溶血させた。LDH buffer [0.2 mg/ml nitro blue tetrazolium chloride (NBT)、10 units/ml Diaphorase、0.5 mg/ml 3-acetylpyridine adenine

dinucleotide (APAD)、0.25 % (v/v) Triton X-100、50 mM sodium-L-lactate、100 mM Tris-HCl; pH 8.0]を各ウェル当たり 100 μ l 加えた。室温、20 分、遮光下で反応させ、SpectraMax® Paradigm にて、波長 650 nm で測定した(57)(図 7)。IC₅₀ は 4 係数ロジスティクス曲線により求め、解析ソフトは GraphPad Prism®ver.6.01(有限会社エムデーエフ)を使用した。阻害率 (%) (% inhibition)は下記の式により算出した。

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{ABS}_{650}(\text{test}) - \text{ABS}_{650}(\text{Negative control})}{\text{ABS}_{650}(\text{positive control}) - \text{ABS}_{650}(\text{Negative control})}$$

2-7.ブタミトコンドリア NADH-cytochrome *c* reductase 活性の測定

ブタミトコンドリアは(58)の方法により調製した。NADH-cytochrome *c* (NADH-cyt *c*)活性は 20 μ M cytochrome *c*、1 mM MgCl₂、2 mM KCN と 30 mM potassium phosphate (pH7.5) の 1 ml 反応液中、25°Cで測定した。NADH-cyt *c* 活性は終濃度 20 μ M NADH を添加後、cytochrome *c* の還元を波長 550 nm で測定した。DMSO に溶解した各濃度のシッカニンを反応液中に添加した。また、コントロールとして終濃度 0.1 % (v/v) DMSO を使用した。IC₅₀ は 4 係数ロジスティクス曲線により求め、解析ソフトは GraphPad Prism®ver.6.01 を使用した。

2-8.細胞毒性試験

ヒト結腸腺癌由来細胞(Human colorectal adenocarcinoma cells: (DLD-1)) (Taiho Pharmaceutical Company)とヒト皮膚線維芽細胞(Human Dermal Fibroblasts: (HDF)) (Taiho Pharmaceutical Company)はそれぞれ非働化した 10 % (v/v) ウシ胎児血清 (FBS)を含む RPMI1640 培地と DMEM/F12 (1:1)培地で、5%CO₂、37℃条件下で CO₂ インキュベーター(ACI-165D,ASTEC)にて培養した。

細胞毒性試験は WST-8 アッセイにて行った。DLD-1 細胞と HDF 細胞を 5,000 cells/ウェルになるように 96 ウェルプレートに 100 μl 播種し、24 時間培養した。培養後、PBS で洗浄し、それぞれに新しい RPMI1640 培地または DMEM/F12 (1:1) 培地を添加した。各濃度のシッカニンとコントロールとして 1 % (v/v) DMSO を加え、48 時間培養した。培養後、PBS で洗浄し、新しい RPMI1640 培地または DMEM/F12 (1:1)培地を添加した。CCK-8 (cell counting kit-8 : 同仁科学研究所)を各ウェル当たり 10 μl 添加し、1-4 時間培養した。培養後、SpectraMax® Paradigm にて、波長 450 nm で測定した。IC₅₀ は 4 係数ロジスティクス曲線により求め、解析ソフトは GraphPad Prism®ver.6.01 を使用した。増殖率 (%) (% Growth)は下記の式により算出した。

$$\% \text{ Growth} = \frac{\text{ABS}_{450} (\text{test}) - \text{ABS}_{450} (\text{Blank})}{\text{ABS}_{450} (\text{DMSO}) - \text{ABS}_{450} (\text{Blank})}$$

2-9. シッカニンとアトバコンによる薬物相互作用試験

シッカニンとアトバコンによる薬物相互作用試験はイソボログラム解析により行った(59, 60)。感染率 0.3 %の 5 %(w/v)ソルビトール処理した熱帯熱マラリア原虫 3D7 株を 100 μ l、96 ウェルプレートを使用し、培養した。各濃度アトバコンと終濃度 10 μ M、7.5 μ M、5.0 μ M、2.5 μ M、1.0 μ M、0.5 μ M シッカニンをそれぞれ組み合わせて培養した。培養 72 時間後、LDH アッセイにてそれぞれの IC_{50} を求めた。FIC (Fractional inhibitory concentration)は下記の式により算出した。

$$FIC = \frac{IC_{50} \text{ of Compound in mixture}}{IC_{50} \text{ of Compound alone}}$$

Combination Index (CI)は下記の式に算出した。

$$CI = \frac{IC_{50} \text{ of Atovaquone in mixture}}{IC_{50} \text{ of Atovaquone alone}} + \frac{IC_{50} \text{ of Siccanin in mixture}}{IC_{50} \text{ of siccanin alone}}$$

$CI > 1$ は相乗効果、 $CI = 1$ は相加効果、 $CI < 1$ は拮抗効果を示す。

3.結果

3-1.複合体 II に対するシッカニンの効果

シッカニンは真菌の複合体 II の強力で選択性の高い阻害剤であり、臨床では足疥癬の治療薬(タックル®第一三共)として使用されていた(61)。また、シッカニンは種特異性も高く、緑膿菌 *P. aeruginosa*、*P. putida*、ラットとマウスの複合体 II は阻害するが、*E. coli*、*Corynebacterium glutamicum*、ブタの複合体 II は阻害しないことが報告されている(53)。そこで、シッカニンによる熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア複合体 II の阻害について、熱帯熱マラリア原虫 3D7 株から調製した粗ミトコンドリア画分を調製し、酵素レベルで調べた。熱帯熱マラリア原虫の複合体 II は QFR 活性と機能している可能性が示されているが(49, 50)、未だに低電位キノンが同定されていないため、QFR 活性の測定はできていない。一方、熱帯熱マラリア原虫の SQR 活性の測定はされており(50)、また SQR 活性の阻害剤は、QFR 活性の阻害効果と相関があることが報告されている(62)。これらの理由により複合体 II の SQR 活性を測定した。その結果、シッカニンは複合体 II の SQR 活性を低濃度で阻害した。また、生物医化学教室が所有するキノン結合部位阻害剤では、シッカニン以外に熱帯熱マラリア原虫の複合体 II の SQR 活性を低濃度で阻害する阻害剤を見出すことはできなかった。興味深いことに、シ

シッカニンによる阻害様式は典型的な二相性の阻害様式を示して、 IC_{50} は第一相では $0.016 \pm 0.006 \mu\text{M}$ 、第二相では $8.93 \pm 2.44 \mu\text{M}$ を示した(図 8)。さらに、シッカニンによる他のマラリア原虫ミトコンドリアに局在するユビキノン還元酵素への阻害効果について、検討を行った。その結果、 $10 \mu\text{M}$ シッカニンは MQO、DHODH と NDH2 は阻害しなかった。G3PDH に対しては $10 \mu\text{M}$ シッカニンはわずかに阻害した(表 3)。これらの結果より、シッカニンはユビキノン還元酵素群の中でも、複合体 II 対して強い阻害効果を示す阻害剤であることが明らかとなった。

3-2.シッカニンによる熱帯熱マラリア原虫に対する阻害効果

熱帯熱マラリア原虫の複合体 II の構成サブユニットである Fp サブユニット遺伝子破壊株は赤内期では増殖遅延を引き起こし、複合体 II の基質であるコハク酸の添加で、熱帯熱マラリア原虫の増殖が回復することが報告されている(48, 49)。マラリア原虫以外の生物において、複合体 II の逆反応であるフマル酸ーキノン還元活性(QFR)を利用することで結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* (63)、回虫 *Ascaris suum* (成虫)(62)、固形ガン(64)などは微好気環境下への適応が可能で、複合体 II は格好の薬剤標的となっている。そこで、シッカニンによる熱帯熱マラリア原虫の複合体 II の阻害で、複合体 II の Fp サブユニット遺伝子破壊株と

同様な増殖遅延が観察されるか否かを、培養系で確認した。その結果、より顕著な効果が観察され、シッカニンは熱帯熱マラリア原虫 3D7 株の増殖を阻害し(図 9A)、その IC₅₀ は 8.40±0.60 μM であった(図 9 B)。また、薬剤耐性株である K1、Dd2 株に対しても同様に増殖を阻害した(表 4)。この様にシッカニンは複合体 II を阻害するだけでなく、熱帯熱マラリア原虫の増殖も阻害することが明らかとなった。

3-3.複合体 II の Fp 遺伝子破壊株に対するシッカニンの阻害効果

Hino および Tanaka らにより、複合体 II の Fp 遺伝子破壊は *P. berghei* と熱帯熱マラリア原虫に対し赤内型の増殖の遅延を引き起こすが致死的でないことが報告されている(48, 49)。一方前項で示したように、シッカニンは熱帯熱マラリア原虫の増殖を顕著に阻害した。この結果から、シッカニンは複合体 II 以外の標的を持つ可能性が考えられた。そこで実際に、シッカニンの標的が複合体 II であるか、二つの実験により検討した。最初に、シッカニンによる増殖阻害効果が複合体 II の基質であるコハク酸またはフマル酸により回復するか否かを検討した。その結果、シッカニンの IC₅₀ は 5 mM コハク酸ナトリウム、フマル酸ナトリウム存在下でもコントロールと変化はなかった(図 9B)。すなわち、TCA 回路の

中間代謝産物の添加は、シッカニンの熱帯熱マラリア原虫に対する増殖阻害効果に影響を与えないことが明らかとなった。次に、複合体 II の Fp 遺伝子破壊株 ($\Delta pfsdh$) を使用し、シッカニンによる $\Delta pfsdh$ 株に対する阻害効果を確認した。シッカニンは $\Delta pfsdh$ 株に対してもコントロールとして使用した full-length 株と同じ IC_{50} を示した(図 9C)。以上の複合体 II の基質であるコハク酸ナトリウム、フマル酸ナトリウムの添加と複合体 II の Fp 遺伝子破壊株を用いた実験の結果、赤内型のシッカニンによる増殖阻害は複合体 II の阻害とは異なる作用機序によることが明らかとなった。

3-4. シッカニンのミトコンドリア複合体 III に対する阻害効果

シッカニンは真菌の複合体 II のユビキノン結合部位に結合することで、複合体 II の活性を阻害することが報告されている(53)。シッカニンは前述したように複合体 II 以外のユビキノン還元酵素を阻害しなかったが、還元型ユビキノン(ユビキノール)を酸化する複合体 III は赤内型の増殖に必要不可欠である(22)。そこで、シッカニンによる複合体 III の阻害について、複合体 III 単独での活性測定が困難なことから DHODH と複合体 III の複合活性である DHO-cytochrome *c* 活性により調べた。その結果、DHODH は 60 μ M シッカニンでも阻害されなかつ

たが(図 10A)、DHO-cyt *c* 活性は低濃度($IC_{50} = 8.39 \pm 2.92 \mu M$)のシッカニンで阻害された(図 10B)。このことから、シッカニンは DHODH ではなく複合体 III を阻害することが明らかとなった。これらの結果より、シッカニンは複合体 III を阻害することで、熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害する可能性が示された。

シッカニンが熱帯熱マラリア原虫の複合体 III を阻害し、マラリア原虫の増殖を阻害するためアトバコン同様に治療薬としての可能性が考えられた。そこで次に、シッカニンの哺乳類ミトコンドリア複合体 III の阻害について、複合体 I と複合体 III の複合活性である NADH-cytochrome *c* 活性により検討した。その結果、高濃度の $500 \mu M$ シッカニンでも NADH-cytochrome *c* 活性は阻害されず、シッカニンは哺乳類の複合体 I、複合体 III を阻害しないことが明らかとなった。これらの結果より、シッカニンは熱帯熱マラリア原虫の複合体 II に加え、複合体 III を特異的に阻害する薬剤であることが明らかとなった。次に、シッカニンによる哺乳類細胞の増殖阻害を調べた。シッカニンはヒト結腸腺癌由来の DLD-1 細胞の増殖を IC_{50} が $34.2 \pm 2.73 \mu M$ で阻害し、シッカニンの熱帯熱マラリア原虫に対する選択性は 4.1 倍だった(表 5)。また、シッカニンは正常細胞である HDF の細胞増殖を IC_{50} が $16.2 \pm 1.20 \mu M$ で阻害し、その選択性は 2.0 倍だった。この様にシッカニンは熱帯熱マラリア原虫により高い阻害効果を持つことが明らかとなった。

3-5. シッカニンとアトバコンのイソボログラム解析

これまでの結果より、シッカニンは熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系の複合体 II と複合体 III に対する強力で選択性の高い阻害剤であり、熱帯熱マラリア原虫の複合体 II に対する初めての阻害剤であることが明らかになった。また、シッカニンは複合体 III よりも複合体 II をより低濃度で阻害し、その選択性は 520 倍(第一相)と 0.93 倍(第二相)だった。マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系は 5 つのユビキノン還元酵素を持つが、その中の 1 つである NDH2 と複合体 III を同時に阻害すると、熱帯熱マラリア原虫の増殖を相乗的に阻害することが報告されている(39)。また、マラロン(アトバコンとプログアニルの合剤)と ACT はイソボログラム解析により、相乗効果または相加効果が得られているために、この解析は臨床応用にも重要である(35, 65)。そこで、複合体 II と複合体 III の同時阻害が熱帯熱マラリア原虫の増殖を相乗的あるいは相加的に阻害するのかをイソボログラム解析により調べた。複合体 II の阻害剤としてシッカニン、複合体 III の阻害剤としてアトバコンを使用した。その結果、シッカニンとアトバコンの組み合わせにより、熱帯熱マラリア原虫の増殖に対して相加的に増殖を阻害し、併用効果を評価する CI 値は 1.04 を示した(図 11)。

3-6. シッカニン誘導体の熱帯熱マラリア原虫の増殖及びミトコンドリア複合体

II と複合体 III に対する阻害効果

シッカニンの哺乳類細胞に対する選択性を高めるため、入手可能なシッカニン誘導体を用い熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害、ミトコンドリア複合体 II と複合体 III に対する阻害効果を検討した。その結果、側鎖を変えたシッカニン誘導体は複合体 II の SQR 活性を阻害しなかったが、その中の SD4 と SD5 は複合体 III をそれぞれ 38.9% と 49.0% 阻害した。しかし、全てのシッカニン誘導体は熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害しなかった(表 6)。

4.考察

本研究は、シッカニンは熱帯熱マラリア原虫の複合体 II を nM オーダーで阻害する初めての阻害剤であることを見出した。また、シッカニンは他のユビキノン還元酵素を阻害しないが、ユビキノールを酸化する複合体 III を μM オーダーで阻害し、実際に熱帯熱マラリア原虫の増殖も阻害することを明らかにした。

4-1.マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系

ヒトのミトコンドリア電子伝達系はエネルギー代謝とピリミジン生合成に必要不可欠である(66)。一方、赤内型のマラリア原虫ではエネルギー代謝はミトコンドリアの電子伝達系ではなく細胞質の解糖系に依存すると考えられている(8)。熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリアの DHODH、MQO、Q-プールと複合体 III は DNA と RNA の生合成のためのピリミジン生合成とプリンサルベージ経路に必要不可欠と報告されている。(22, 28)。粗ミトコンドリア画分からのユビキノン還元酵素活性測定の結果、MQO は DHODH よりも比活性が高いことから、生化学的な観点からも、MQO は赤内型のマラリア原虫で機能していると考えられ(表 3)、格好の新規抗マラリア薬の薬剤標的である。しかし、ミトコンドリア MQO

に対する酵素学的な解析は未だに行われておらず、特異的な阻害剤も見出されていない。今後、MQOの特異的阻害剤を用いたケミカルバイオロジーからの解析が必要不可欠であり、現在当研究室で組換え酵素による研究が進められている。

G3PDHは宿主であるヒトでは、解糖系により産生したNADHを再酸化するグリセロール3リン酸シャトルや脂肪酸合成に必要な不可欠な酵素で(67)、メトホルミンによる2型糖尿病の薬剤標的となっている(68)。一方、マラリア原虫では、G3PDHの機能は未だに明らかになっていない。本研究でG3PDH活性測が観察されたことから、赤内型のマラリア原虫内で機能していることが明らかになった。今後、詳細にG3PDHの機能を解析するため遺伝子破壊や阻害剤による研究が必要である。

4-2 マラリア原虫の複合体 II

赤内型の熱帯熱マラリア原虫におけるTCA回路と複合体IIのQFR活性の必要性は未だに明らかになっていない(51)。当研究室では、複合体IIの構成サブユニットであるFp遺伝子破壊が増殖遅延を引き起こし、その増殖遅延はコハク酸の添加により回復することを報告してきた(49)。また、マウスマラリア原

虫 *P. berghei* において、複合体 II の遺伝子破壊株は、蚊ステージで発育できないことを報告した(37, 48)。既存の複合体 II の阻害剤はマラリア原虫の複合体 II の活性を阻害しないことが報告されている(24, 43)。しかし、本研究により初めてマラリア原虫の複合体 II を阻害するシッカニンを見出した。シッカニンは蚊ステージの発育に必要不可欠である複合体 II を低濃度で阻害することから、マラリア伝播阻止薬として有望である。さらに、シッカニンはマラリア原虫の複合体 II の機能やその特徴の解析を行うため、極めて有用なツールであると考えられる。シッカニンを利用した酵素に対する生化学的な解析の結果、興味深いことにシッカニンはマラリア原虫の複合体 II に対して二相性の阻害形式を示した。その IC₅₀ は第一相では 0.016 μM で第二相では 8.93 μM であった(図 8)。

この二相性の阻害形式は *S. cerevisiae* の複合体 II に対する Dinitrophenol 誘導体でも観察されており、二つのユビキノン結合部位を持つことを示唆している(69)。二つのユビキノン結合部位を持つ複合体 II が、SQR の逆反応である QFR 活性を持つことが *E. coli* と *Wolinella succinogenes* の複合体 II の結晶構造解析や生化学的な解析により明らかになっている(70-73)。これらの結果から、マラリア原虫の複合体 II は二つのユビキノン結合部位を持ち、SQR の逆反応である QFR 活性として機能している可能性が考えられる。QFR 活性は回虫やエキソコックスのような嫌気的環境下で生育する寄生虫で、低酸素適応に必要不可欠

であるため薬剤標的として研究されている(74, 75)。マラリア原虫は赤内型ステージ、蚊ステージ、そして肝臓ステージと複数の環境で増殖発育する(図 2)。このため、マラリア原虫は QFR を利用することでこの劇的に変化する環境変化に適応している可能性が考えられる。実際に当研究室では熱帯熱マラリア原虫の培養系とミトコンドリア呼吸鎖において、QFR として機能していることを示している(49, 50)。また Daily らが、マラリア患者由来の熱帯熱マラリア原虫の遺伝子発現解析を行ったところ、発現パターンが *in vitro* 培養と同様に解糖系に依存した発現パターンと TCA 回路、電子伝達系に依存した発現パターンの原虫が得られた(51)。この報告より、マラリア原虫は赤内型においてもある環境下では、ミトコンドリアに依存したエネルギー代謝を行うと考えられる。TCA 回路と電子伝達系を結ぶ複合体 II の阻害剤であるシッカニンを用いた解析から、マラリア原虫の環境適応の機構を明らかにすることができると考えられる。

4-3. 複合体 III に対するシッカニンの効果

本研究ではシッカニンは複合体 II だけではなく複合体 III も阻害することを示した。複合体 II の遺伝子破壊による増殖遅延は複合体 II の基質であるコハク酸

の添加により回復したが(49)、シッカニンによる阻害効果はコハク酸またはフマル酸では回復しなかった(図 9B)。また、複合体 II の遺伝子破壊株である Δ pfsdh 株はシッカニンに対する IC₅₀ がコントロールである full-length 株と変わらなかった (図 9A)。さらに、シッカニンは熱帯熱マラリア原虫の複合体 III を阻害した(IC₅₀=8.4 μ M)。これらの結果により、シッカニンは複合体 II ではなく主に複合体 III を阻害することで熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害する可能性が考えられる。シッカニンは赤内型の原虫に必須である複合体 III も標的にするため、複数の標的を持つ新規抗マラリア薬として有望であり、さらに複数の作用機序を持つため臨床においても、薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫の出現が起こりにくいと考えられる。

熱帯熱マラリア原虫の複合体 II の機能に関する詳細な解析は未だに行われていなかった。ミトコンドリア電子伝達系の酵素の一つである NDH2 は赤内型では遺伝子破壊が可能であるが、NDH2 の特異的な阻害剤により、熱帯熱マラリア原虫の増殖が阻害されることが報告された(31, 32)。さらに、NDH2 の阻害剤と複合体 III の阻害剤であるアトバコンを組み合わせることで、熱帯熱マラリア原虫に対して相乗的に増殖を阻害することが報告された(39)。この事実はミトコンドリア電子伝達系の酵素を同時に阻害することでその阻害効果が増大することを示している。実際に本研究では、複合体 II と複合体 III の機能を同時に阻害

することによる熱帯熱マラリア原虫の増殖に対する影響を確認した。複合体 II の阻害剤であるシッカニンと複合体 III の阻害剤であるアトバコンを組み合わせるイソボログラム解析の結果、熱帯熱マラリア原虫に対して、相加効果を示す結果が得られた(図 11)。イソボログラム解析による結果は、シッカニンがアトバコンとは異なる作用機序を持つことを示唆しており、また複合体 II が赤内型で機能している可能性を示している。

一方、シッカニンは複合体 III も阻害した。複合体 III は二つの異なるキノン結合部位、Qo 部位と Qi 部位を持つ。アトバコンは Qo 部位に対する強力な阻害剤である(24, 33)。今回のこのイソボログラム解析の結果からシッカニンはアトバコンとは作用機序が異なることが示唆されたが、この結果からシッカニンが Qi 部位に結合する可能性も考えられる。今後の更なる詳細な解析として、Qo 部位に変異をもつアトバコン耐性株を用いた、シッカニンの培養系での阻害効果と粗ミトコンドリア画分による複合体 III のシッカニンの阻害効果の検討を考えている。

4-4.新規抗マラリア薬としてのシッカニン

シッカニンが熱帯熱マラリア原虫の複合体 II と複合体 III を阻害し、また赤内

型の熱帯熱マラリア原虫の増殖も阻害することが明らかとなった。さらに、シッカニンは薬剤耐性株である K1 と Dd2 株に対しても同様の阻害効果を示した。また、哺乳類の複合体 I、II、III を阻害せず(表 5)、ヒト細胞を用いた細胞毒性試験でも DLD-1 細胞では選択性が 4.1 倍、HDF 細胞では選択性が 2.0 倍と、決して高くはないが熱帯熱マラリア原虫に対し特異的に阻害する阻害剤であることが明らかとなった(表 5)。シッカニンはすでに臨床で使用されていたため、安全性は確認されている。さらに、シッカニンは哺乳類ミトコンドリアの複合体 I、複合体 II と複合体 III を阻害しないにもかかわらず、癌細胞である DLD-1 細胞の増殖を阻害した。このため、シッカニンは抗ガン剤としての可能性も考えられる。しかし正常細胞である HDF の増殖も阻害したため、抗マラリア薬または抗ガン剤として開発するためには、ヒト細胞に対するシッカニンの薬剤標的の解析及び選択性の高いシッカニン誘導体を見出すこととヒト細胞に対する作用機序を解明することが必要である。本研究ではシッカニンより熱帯熱マラリア原虫の増殖に対する高い阻害効果を示す誘導体は見出せなかった(表 6)。今後さらなるシッカニン誘導体を用いた構造活性相関の情報が必要である。

シッカニンは熱帯熱マラリア原虫の蚊ステージの発育に必要不可欠である複合体 II と赤内型の増殖に必要な不可欠な複合体 III を同時に阻害するため、シッカニンは患者に対する新規抗マラリア薬及び新規伝播阻止薬として有望な化合物

である。また、熱帯熱マラリア原虫の肝臓ステージでは、複合体 III の機能が必須であると考えられており、複合体 III の阻害剤が肝臓ステージでの原虫の増殖を阻害することが報告されている(76)。シッカニンも肝臓ステージの原虫の増殖を阻害する可能性が考えられ、今後肝臓ステージに対しての阻害効果を検討する必要がある。

5.結論

シッカニン¹はマラリア原虫ミトコンドリアの複合体 II を nM オーダーで阻害する初めての阻害剤である。さらに、複合体 III を μM オーダーで阻害し、熱帯熱マラリア原虫の増殖も阻害した。蚊ステージでの原虫の発育に必要不可欠である複合体 II と赤内型の原虫の増殖に必要不可欠である複合体 III を同時に阻害するため、マラリア伝播阻止薬と新規抗マラリア薬として有望である。

シッカニンによる阻害の生化学的解析の結果、マラリア原虫の複合体 II はキノン結合部位を 2 つもつ可能性を示し、quinol-fumarate reductase(QFR)としても機能することを示唆した。さらに、シッカニンは複合体 III の阻害剤であるアトバコン²に対して相加的に原虫の増殖阻害効果を与えた。以上の結果は複合体 II が赤内型原虫内で、機能している可能性を示している。

シッカニンはマラリア原虫複合体 II の機能解析を行うのに重要なツールであり、今後シッカニン及びその誘導体を用いた構造活性相関の情報が必要である。さらにシッカニンには新規治療薬または伝播阻止薬としての可能性がある。そのためには、アトバコン耐性熱帯熱マラリア原虫を用いた解析が必要であり、当研究室で作成したアトバコン耐性株を用いた実験を予定している。私はこれまでにサプリメントとして用いられている 5-アミノレブリン酸³が熱帯熱マラリア

原虫の増殖を抑えることを見出した(77)。5-アミノレブリン酸は感染マウスに効果を示し、治癒したマウスは再感染に抵抗性を示す(78)。免疫が成立しているのである。既存の薬剤に加え、この様に穏やかな抗マラリア薬と本研究で見出した赤内型のみならず伝播阻止に効果を示すことが期待されるシッカニンにより、マラリア制圧の一助となることが期待できる。

6.展望

シッカニンは熱帯熱マラリア原虫の複合体 II と複合体 III を阻害し、また熱帯熱マラリア原虫の増殖を μM オーダーで阻害した。赤内型では複合体 III が生存に必要不可欠なためシッカニンは複合体 III を阻害することでマラリア原虫の増殖も阻害すると考えられる。シッカニンの赤内型の標的が複合体 III であることを示すには、今後アトバコン耐性株を使用した実験が必要である。yeast DHODH を発現させた熱帯熱マラリア原虫は複合体 III の阻害剤であるアトバコン、スチグマテリンに対して耐性になることが報告されている(79)。この yeast DHODH 発現原虫を使用することで、シッカニンの熱帯熱マラリア原虫の赤内型での作用機序が複合体 III であることを直接示すことができる。

シッカニンはイソボログラム解析の結果、アトバコンと作用機序が異なり、熱帯熱マラリア原虫の複合体 III の Qi 部位に結合する可能性を示した。シッカニンが Qi 部位に結合することで、複合体 III を阻害するか否かについては、複合体 III の cytochrome *b* サブユニットの Qo 部位に変異があるアトバコン耐性株からミトコンドリア画分を調製し、シッカニンによるアトバコン耐性株の複合体 III の阻害を調べることで明確にできる。

最後に、熱帯熱マラリア原虫の複合体 II が QFR 活性を持つことを直接示す必

要がある。生物医化学教室の以前の研究で、複合体 II の Fp 遺伝子破壊株の増殖遅延がコハク酸により回復し、ミトコンドリア画分を用いた研究では、QFR 活性を持つ可能性を示した(49, 50)。しかし、複合体 II の QFR 活性は未だに測定されていない。SQR 活性の阻害剤は、QFR 活性の阻害効果と相関があることが報告されているが(62)、実際にシッカニンが QFR 活性を阻害するか確認する必要がある。そのために、今後熱帯熱マラリア原虫の複合体 II の QFR 活性について研究を進める予定である。

7.引用文献

1. **World Health Organization.** 2015. World malaria report: 2015.
2. **White NJ.** 2008. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis **46**:172-173.
3. **Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Ariey F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ.** 2009. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med **361**:455-467.
4. **Blagborough AM, Churcher TS, Upton LM, Ghani AC, Gething PW, Sinden RE.** 2013. Transmission-blocking interventions eliminate malaria from laboratory populations. Nat Commun **4**:1812.
5. **Feagin JE, Werner E, Gardner MJ, Williamson DH, Wilson RJ.** 1992. Homologies between the contiguous and fragmented rRNAs of the two *Plasmodium falciparum* extrachromosomal DNAs are limited to core sequences. Nucleic Acids Res **20**:879-887.
6. **Aikawa M.** 1966. The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites, *Plasmodium fallax*, *P. lophurae*, and *P. cathemerium*. Am J Trop Med Hyg **15**:449-471.
7. **Okamoto N, Spurck TP, Goodman CD, McFadden GI.** 2009. Apicoplast and mitochondrion in gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum*. Eukaryot Cell **8**:128-132.
8. **BRYANT C, VOLLER A, SMITH MJ.** 1964. THE INCORPORATION OF RADIOACTIVITY FROM (14C)GLUCOSE INTO THE SOLUBLE METABOLIC INTERMEDIATES OF MALARIA PARASITES. Am J Trop Med Hyg **13**:515-519.
9. **Mather MW, Henry KW, Vaidya AB.** 2007. Mitochondrial drug targets in apicomplexan parasites. Curr Drug Targets **8**:49-60.
10. **Hikosaka K, Komatsuya K, Suzuki S, Kita K.** 2015. Mitochondria of Malaria Parasites as a Drug Target, p 953-978. In Samie A (ed), An Overview of Tropical Diseases. INTEC.
11. **HATEFI Y, HAAVIK AG, GRIFFITHS DE.** 1962. Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-

- coenzyme Q reductase. *J Biol Chem* **237**:1676-1680.
12. **Beinert H.** 2002. Spectroscopy of succinate dehydrogenases, a historical perspective. *Biochim Biophys Acta* **1553**:7-22.
 13. **Hines V, Keys LD, Johnston M.** 1986. Purification and properties of the bovine liver mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase. *J Biol Chem* **261**:11386-11392.
 14. **Janssen MJ, van Voorst F, Ploeger GE, Larsen PM, Larsen MR, de Kroon AI, de Kruijff B.** 2002. Photolabeling identifies an interaction between phosphatidylcholine and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gut2p) in yeast mitochondria. *Biochemistry* **41**:5702-5711.
 15. **Zhang J, Frerman FE, Kim JJ.** 2006. Structure of electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase and electron transfer to the mitochondrial ubiquinone pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:16212-16217.
 16. **Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B.** 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**:300-305.
 17. **Gubern M, Andriamihaja M, Nübel T, Blachier F, Bouillaud F.** 2007. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J* **21**:1699-1706.
 18. **Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, Pain A, Nelson KE, Bowman S, Paulsen IT, James K, Eisen JA, Rutherford K, Salzberg SL, Craig A, Kyes S, Chan MS, Nene V, Shallom SJ, Suh B, Peterson J, Angiuoli S, Pertea M, Allen J, Selengut J, Haft D, Mather MW, Vaidya AB, Martin DM, Fairlamb AH, Fraunholz MJ, Roos DS, Ralph SA, McFadden GI, Cummings LM, Subramanian GM, Mungall C, Venter JC, Carucci DJ, Hoffman SL, Newbold C, Davis RW, Fraser CM, Barrell B.** 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **419**:498-511.
 19. **Takeo S, Kokaze A, Ng CS, Mizuchi D, Watanabe JI, Tanabe K, Kojima S, Kita K.** 2000. Succinate dehydrogenase in *Plasmodium falciparum* mitochondria: molecular characterization of the SDHA and SDHB genes for the catalytic subunits, the flavoprotein (Fp) and iron-sulfur (Ip) subunits. *Mol Biochem Parasitol* **107**:191-205.
 20. **Phillips MA, Rathod PK.** 2010. *Plasmodium* dihydroorotate dehydrogenase: a promising target for novel anti-malarial chemotherapy. *Infect Disord Drug Targets* **10**:226-239.
 21. **Nixon GL, Pidathala C, Shone AE, Antoine T, Fisher N, O'Neill PM, Ward SA, Biagini GA.** 2013. Targeting the mitochondrial electron transport chain of

- Plasmodium falciparum*: new strategies towards the development of improved antimalarials for the elimination era. *Future Med Chem* **5**:1573-1591.
22. **Painter HJ, Morrisey JM, Mather MW, Vaidya AB.** 2007. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* **446**:88-91.
 23. **Fry M, Webb E, Pudney M.** 1990. Effect of mitochondrial inhibitors on adenosinetriphosphate levels in *Plasmodium falciparum*. *Comp Biochem Physiol B* **96**:775-782.
 24. **Srivastava IK, Morrisey JM, Darrouzet E, Daldal F, Vaidya AB.** 1999. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Mol Microbiol* **33**:704-711.
 25. **Coteron JM, Marco M, Esquivias J, Deng X, White KL, White J, Koltun M, El Mazouni F, Kokkonda S, Katneni K, Bhamidipati R, Shackleford DM, Angulo-Barturen I, Ferrer SB, Jiménez-Díaz MB, Gamo FJ, Goldsmith EJ, Charman WN, Bathurst I, Floyd D, Matthews D, Burrows JN, Rathod PK, Charman SA, Phillips MA.** 2011. Structure-guided lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase inhibitors with clinical candidate potential. *J Med Chem* **54**:5540-5561.
 26. **Björnberg O, Rowland P, Larsen S, Jensen KF.** 1997. Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* investigated by chemical modification and mutagenesis. *Biochemistry* **36**:16197-16205.
 27. **Nagy M, Lacroute F, Thomas D.** 1992. Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8966-8970.
 28. **Ke H, Lewis IA, Morrisey JM, McLean KJ, Ganesan SM, Painter HJ, Mather MW, Jacobs-Lorena M, Llinás M, Vaidya AB.** 2015. Genetic investigation of tricarboxylic acid metabolism during the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Cell Rep* **11**:164-174.
 29. **Chaudhary K, Darling JA, Fohl LM, Sullivan WJ, Donald RG, Pfefferkorn ER, Ullman B, Roos DS.** 2004. Purine salvage pathways in the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **279**:31221-31227.
 30. **Booden T, Hull RW.** 1973. Nucleic acid precursor synthesis by *Plasmodium lophurae* parasitizing chicken erythrocytes. *Exp Parasitol* **34**:220-228.
 31. **Vallières C, Fisher N, Antoine T, Al-Helal M, Stocks P, Berry NG, Lawrenson AS, Ward SA, O'Neill PM, Biagini GA, Meunier B.** 2012. HDQ, a potent

- inhibitor of *Plasmodium falciparum* proliferation, binds to the quinone reduction site of the cytochrome bc1 complex. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:3739-3747.
32. **Biagini GA, Fisher N, Berry N, Stocks PA, Meunier B, Williams DP, Bonar-Law R, Bray PG, Owen A, O'Neill PM, Ward SA.** 2008. Acridinediones: selective and potent inhibitors of the malaria parasite mitochondrial bc1 complex. *Mol Pharmacol* **73**:1347-1355.
 33. **Siregar JE, Kurisu G, Kobayashi T, Matsuzaki M, Sakamoto K, Mi-ichi F, Watanabe Y, Hirai M, Matsuoka H, Syafruddin D, Marzuki S, Kita K.** 2015. Direct evidence for the atovaquone action on the *Plasmodium* cytochrome bc1 complex. *Parasitol Int* **64**:295-300.
 34. **Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC, Pasvol G.** 2002. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J* **1**:1.
 35. **Lütgendorf C, Rojanawatsirivet C, Wernsdorfer G, Sirichaisinthop J, Kollaritsch H, Wernsdorfer WH.** 2006. Pharmacodynamic interaction between atovaquone and other antimalarial compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Wien Klin Wochenschr* **118**:70-76.
 36. **Fry M, Beesley JE.** 1991. Mitochondria of mammalian *Plasmodium* spp. *Parasitology* **102 Pt 1**:17-26.
 37. **Boysen KE, Matuschewski K.** 2011. Arrested oocyst maturation in *Plasmodium* parasites lacking type II NADH:ubiquinone dehydrogenase. *J Biol Chem* **286**:32661-32671.
 38. **Biagini GA, Fisher N, Shone AE, Mubarak MA, Srivastava A, Hill A, Antoine T, Warman AJ, Davies J, Pidathala C, Amewu RK, Leung SC, Sharma R, Gibbons P, Hong DW, Pacorel B, Lawrenson AS, Charoensutthivarakul S, Taylor L, Berger O, Mbekeani A, Stocks PA, Nixon GL, Chadwick J, Hemingway J, Delves MJ, Sinden RE, Zeeman AM, Kocken CH, Berry NG, O'Neill PM, Ward SA.** 2012. Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:8298-8303.
 39. **Biagini GA, Viriyavejakul P, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA.** 2006. Functional characterization and target validation of alternative complex I of *Plasmodium falciparum* mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1841-1851.

40. **Cecchini G.** 2003. Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem* **72**:77-109.
41. **Millar AH, Eubel H, Jansch L, Krufft V, Heazlewood JL, Braun HP.** 2004. Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Mol Biol* **56**:77-90.
42. **Morales J, Mogi T, Mineki S, Takashima E, Mineki R, Hirawake H, Sakamoto K, Omura S, Kita K.** 2009. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. *J Biol Chem* **284**:7255-7263.
43. **Kawahara K, Mogi T, Tanaka TQ, Hata M, Miyoshi H, Kita K.** 2009. Mitochondrial dehydrogenases in the aerobic respiratory chain of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *J Biochem* **145**:229-237.
44. **Mogi T, Kita K.** 2010. Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. *Parasitol Int* **59**:305-312.
45. **Mogi T, Kita K.** 2009. Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits a and b in *Plasmodium* spp. *Mitochondrion* **9**:443-453.
46. **Miyadera H, Shiomi K, Ui H, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Miyoshi H, Osanai A, Kita K, Omura S.** 2003. Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:473-477.
47. **Suraveratum N, Krungkrai SR, Leangaramgul P, Prapunwattana P, Krungkrai J.** 2000. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* succinate dehydrogenase. *Mol Biochem Parasitol* **105**:215-222.
48. **Hino A, Hirai M, Tanaka TQ, Watanabe Y, Matsuoka H, Kita K.** 2012. Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *J Biochem* **152**:259-268.
49. **Tanaka TQ, Hirai M, Watanabe Y, Kita K.** 2012. Toward understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: gene targeting of the Fp subunit. *Parasitol Int* **61**:726-728.
50. **Takashima E, Takamiya S, Takeo S, Mi-ichi F, Amino H, Kita K.** 2001. Isolation of mitochondria from *Plasmodium falciparum* showing dihydroorotate dependent respiration. *Parasitol Int* **50**:273-278.
51. **Daily JP, Scanfled D, Pochet N, Le Roch K, Plouffe D, Kamal M, Sarr O, Mboup S, Ndir O, Wypij D, Levasseur K, Thomas E, Tamayo P, Dong C, Zhou Y, Lander ES, Ndiaye D, Wirth D, Winzeler EA, Mesirov JP, Regev A.**

2007. Distinct physiological states of *Plasmodium falciparum* in malaria-infected patients. *Nature* **450**:1091-1095.
52. **Nose K, Endo A.** 1971. Mode of action of the antibiotic siccanin on intact cells and mitochondria of Trichophyton mentagrophytes. *J Bacteriol* **105**:176-184.
 53. **Mogi T, Kawakami T, Arai H, Igarashi Y, Matsushita K, Mori M, Shiomi K, Omura S, Harada S, Kita K.** 2009. Siccanin rediscovered as a species-selective succinate dehydrogenase inhibitor. *J Biochem* **146**:383-387.
 54. **Trager W, Jensen JB.** 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**:673-675.
 55. **Lambros C, Vanderberg JP.** 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* **65**:418-420.
 56. **Mi-Ichi F, Miyadera H, Kobayashi T, Takamiya S, Waki S, Iwata S, Shibata S, Kita K.** 2005. Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: inhibitory effect of licochalcone A on the Plasmodium falciparum respiratory chain. *Ann N Y Acad Sci* **1056**:46-54.
 57. **Gamo FJ, Sanz LM, Vidal J, de Cozar C, Alvarez E, Lavandera JL, Vanderwall DE, Green DV, Kumar V, Hasan S, Brown JR, Peishoff CE, Cardon LR, Garcia-Bustos JF.** 2010. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **465**:305-310.
 58. **Smith AL, Hansen M.** 1964. Evidence for P/O ratios approaching 6 in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **15**:431-435.
 59. **Agarwal D, Sharma M, Dixit SK, Dutta RK, Singh AK, Gupta RD, Awasthi SK.** 2015. In vitro synergistic effect of fluoroquinolone analogues in combination with artemisinin against Plasmodium falciparum; their antiplasmodial action in rodent malaria model. *Malar J* **14**:48.
 60. **Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC.** 2004. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4097-4102.
 61. **Arai M, Ishibashi K, Okazaki H.** 1969. Siccanin, a new antifungal antibiotic. I. In vitro studies. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* **9**:247-252.
 62. **Osanai A, Harada S, Sakamoto K, Shimizu H, Inaoka DK, Kita K.** 2009. Crystallization of mitochondrial rho-quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with the specific inhibitor flutolanil. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**:941-944.

63. **Hartman T, Weinrick B, Vilchèze C, Berney M, Tufariello J, Cook GM, Jacobs WR.** 2014. Succinate dehydrogenase is the regulator of respiration in *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog **10**:e1004510.
64. **Tomitsuka E, Kita K, Esumi H.** 2009. Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **85**:258-265.
65. **Canfield CJ, Pudney M, Gutteridge WE.** 1995. Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro. Exp Parasitol **80**:373-381.
66. **Hatefi Y.** 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu Rev Biochem **54**:1015-1069.
67. **Houstèk J, Cannon B, Lindberg O.** 1975. Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown-adipose tissue. Eur J Biochem **54**:11-18.
68. **Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, Prigaro BJ, Wood JL, Bhanot S, MacDonald MJ, Jurczak MJ, Camporez JP, Lee HY, Cline GW, Samuel VT, Kibbey RG, Shulman GI.** 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. Nature **510**:542-546.
69. **Iverson TM, Luna-Chavez C, Croal LR, Cecchini G, Rees DC.** 2002. Crystallographic studies of the *Escherichia coli* quinol-fumarate reductase with inhibitors bound to the quinol-binding site. J Biol Chem **277**:16124-16130.
70. **Lancaster CR, Kröger A, Auer M, Michel H.** 1999. Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. Nature **402**:377-385.
71. **Salerno JC, Harmon HJ, Blum H, Leigh JS, Ohnishi T.** 1977. A transmembrane quinone pair in the succinate dehydrogenase--cytochrome *b* region. FEBS Lett **82**:179-182.
72. **Hägerhäll C, Magnitsky S, Sled VD, Schröder I, Gunsalus RP, Cecchini G, Ohnishi T.** 1999. An *Escherichia coli* mutant quinol:fumarate reductase contains an EPR-detectable semiquinone stabilized at the proximal quinone-binding site. J Biol Chem **274**:26157-26164.
73. **Westenberg DJ, Gunsalus RP, Ackrell BA, Cecchini G.** 1990. Electron transfer from menaquinol to fumarate. Fumarate reductase anchor polypeptide mutants of *Escherichia coli*. J Biol Chem **265**:19560-19567.
74. **Amino H, Wang H, Hirawake H, Saruta F, Mizuchi D, Mineki R, Shindo N,**

- Murayama K, Takamiya S, Aoki T, Kojima S, Kita K.** 2000. Stage-specific isoforms of *Ascaris suum* complex. II: The fumarate reductase of the parasitic adult and the succinate dehydrogenase of free-living larvae share a common iron-sulfur subunit. *Mol Biochem Parasitol* **106**:63-76.
75. **Matsumoto J, Sakamoto K, Shinjyo N, Kido Y, Yamamoto N, Yagi K, Miyoshi H, Nonaka N, Katakura K, Kita K, Oku Y.** 2008. Anaerobic NADH-fumarate reductase system is predominant in the respiratory chain of *Echinococcus multilocularis*, providing a novel target for the chemotherapy of alveolar echinococcosis. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:164-170.
76. **da Cruz FP, Martin C, Buchholz K, Lafuente-Monasterio MJ, Rodrigues T, Sönnichsen B, Moreira R, Gamo FJ, Marti M, Mota MM, Hannus M, Prudêncio M.** 2012. Drug screen targeted at *Plasmodium* liver stages identifies a potent multistage antimalarial drug. *J Infect Dis* **205**:1278-1286.
77. **Komatsuya K, Hata M, Balogun EO, Hikosaka K, Suzuki S, Takahashi K, Tanaka T, Nakajima M, Ogura S, Sato S, Kita K.** 2013. Synergy of ferrous ion on 5-aminolevulinic acid-mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*. *J Biochem* **154**:501-504.
78. **Suzuki S, Hikosaka K, Balogun EO, Komatsuya K, Niikura M, Kobayashi F, Takahashi K, Tanaka T, Nakajima M, Kita K.** 2015. In Vivo Curative and Protective Potential of Orally Administered 5-Aminolevulinic Acid plus Ferrous Ion against Malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:6960-6967.
79. **Fisher N, Abd Majid R, Antoine T, Al-Helal M, Warman AJ, Johnson DJ, Lawrenson AS, Ranson H, O'Neill PM, Ward SA, Biagini GA.** 2012. Cytochrome *b* mutation Y268S conferring atovaquone resistance phenotype in malaria parasite results in reduced parasite *bc1* catalytic turnover and protein expression. *J Biol Chem* **287**:9731-9741.

図表

表 1. 既存の複合体 II 阻害剤と *Plasmodium spp.* に対する選択性

阻害剤	SQR IC ₅₀ [μM]		選択性
	<i>Plasmodium spp.</i>	Mammal	
マロン酸	13.2±0.49 ^{*a}	3.4 ^{*c}	0.26
TTFA	>50 ^{*a}	5.4 ^{*d}	<0.11
アトペニン A5	4.6±0.2 ^{*b}	0.004 ^{*d}	0.00087
カルボキシシン	3.6±1.0 ^{*b}	1.0 ^{*d}	0.28

*a, 熱帯熱マラリア原虫のミトコンドリア(47); *b, *P. yoelii yoelii* のミトコンドリア(43); *c, ブタミトコンドリア(53); *d, ブタミトコンドリア(46). 選択性は各阻害剤の哺乳類ミトコンドリアに対する IC₅₀ を *Plasmodium spp.* の IC₅₀ で割った値を計算して使用した。

表 2. シッカニンの各生物種の SQR 活性に対する阻害

生物種	シッカニン IC ₅₀ [μM]
ブタ	860
ラット	9
<i>Escherichia coli</i>	210
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.87
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0.09

(53)を引用した。

表 3. 熱帯熱マラリア原虫の粗ミトコンドリア画分のユビキノン還元酵素の比活性とユビキノン還元酵素群に対するシッカニンの阻害効果

熱帯熱マラリア原虫 3D7 から精製した粗ミトコンドリア画分を用いて DHODH、MQO、G3PDH、SQR、NDH2 の比活性 (nmol/min/mg) を測定した。終濃度 10 μ M シッカニン存在下での各酵素の活性を求めた。残存活性[%] は終濃度 0.1% (v/v) DMSO 存在下の各酵素の活性を 100% として算出した。比活性と残存活性は平均 \pm SD で示し、n=3 で行った。

ユビキノン還元酵素	比活性 [nmol/min/mg]	残存活性[%]
DHODH	13.4 \pm 1.2	101.2 \pm 8.1
MQO	17.5 \pm 1.1	109.2 \pm 2.0
G3PDH	7.25 \pm 0.1	72.5 \pm 4.0
SQR	7.63 \pm 1.3	2.7 \pm 6.5
NDH2	32.3 \pm 1.6	101.8 \pm 8.1

表 4. シッカニンの熱帯熱マラリア原虫の増殖に対する阻害効果

熱帯熱マラリア原虫、K1(クロロキン耐性)、Dd2(多剤耐性)株に対するシッカニンの増殖阻害効果を LDH アッセイにて測定した。IC₅₀ は平均 \pm SD で示し、n=3 で行った。

熱帯熱マラリア原虫	シッカニン IC ₅₀ [μ M]
3D7	8.40 \pm 0.60
K1	4.76 \pm 0.68
Dd2	8.62 \pm 2.61

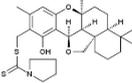
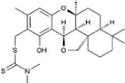
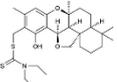
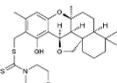
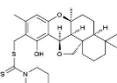
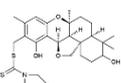
表 5. 熱帯熱マラリア原虫と哺乳類ミトコンドリア複合体 II と複合体 III に対するシッカニンの選択性

酵素	シッカニン IC ₅₀ [μM]		選択性
	<i>P. falciparum</i>	Mammal	
複合体 II	0.016	861 ^a	57400
複合体 III	8.93	>500	96
増殖	8.39	34.2 ^b	>60
	8.40	16.1 ^c	4.1
			1.9

a, (53)を引用した。b, DLD-1 細胞。c, HDF 細胞。

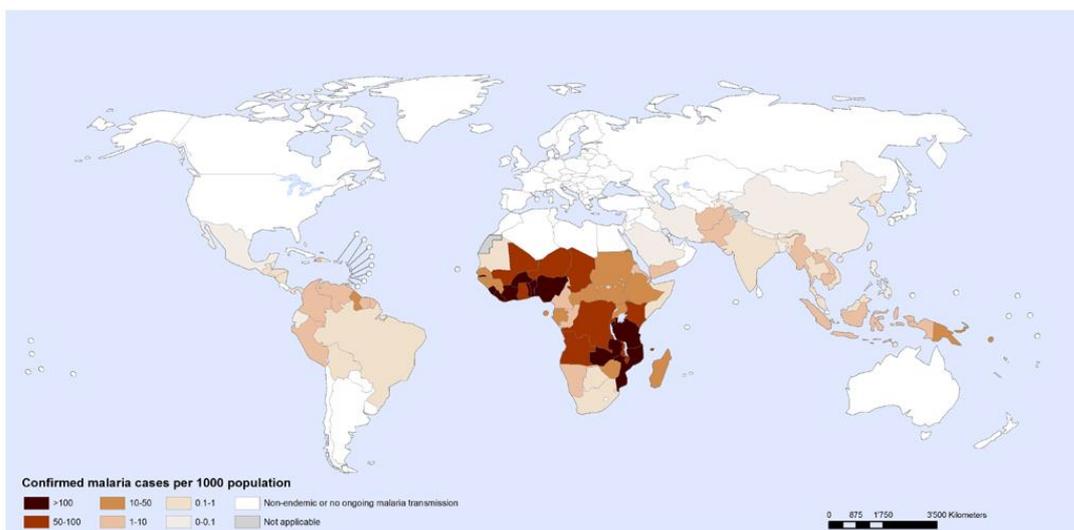
選択性はシッカニンの哺乳類 SQR 活性に対する IC₅₀ を熱帯熱マラリア原虫 SQR 活性に対する IC₅₀ で割った値を示している。

表6. シッカニン誘導体の熱帯熱マラリア原虫の増殖及び複合体IIと複合体IIIに対する阻害効果

Sicacnin derivatives (SD)	構造	阻害率[%]		
		SQR	DHO-cyt <i>c</i>	増殖
SD1		8.9±12.4	0.0±14.2	6.0±4.1
SD2		0.5±5.3	1.1±8.6	1.0±9.5
SD3		0.0±0.4	3.5±15.4	2.6±1.1
SD4		5.2±3.8	61.1±8.5	5.3±1.2
SD5		7.4±3.7	51.0±17.1	1.2±1.1
SD6		2.7±16.3	0.0±14.0	0.0±3.7

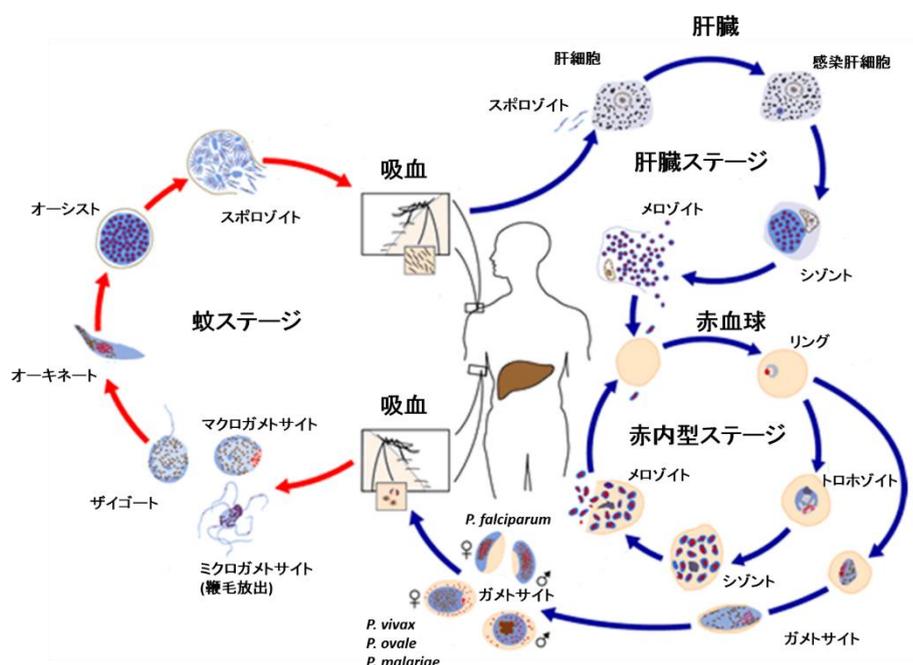
熱帯熱マラリア原虫 3D7 から精製した粗ミトコンドリア画分を用いて SQR、DHO-cytochrome *c* (DHO-cyt *c*)活性を測定した。終濃度 10 μM シッカニン誘導体存在下での各酵素の活性を求めた。熱帯熱マラリア原虫(3D7)株に対する終濃度 10 μM シッカニン誘導体の増殖阻害効果を LDH アッセイにて測定した。阻害率 [%]平均±SD で示し、n=3 で行った。

図 1.マラリアの 2014 年の流行状況



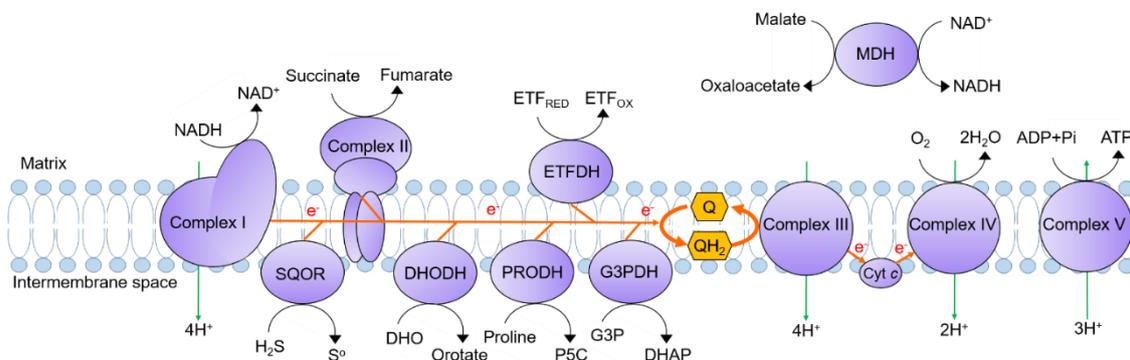
World malaria report 2015 によるとマラリアはアフリカを中心として熱帯地域で流行している。有効なワクチンがなく、薬剤耐性の出現からマラリア制圧は困難を極めている(1)。図は <http://www.who.int/gho/malaria/en/> から引用

図 2.マラリア原虫の生活環

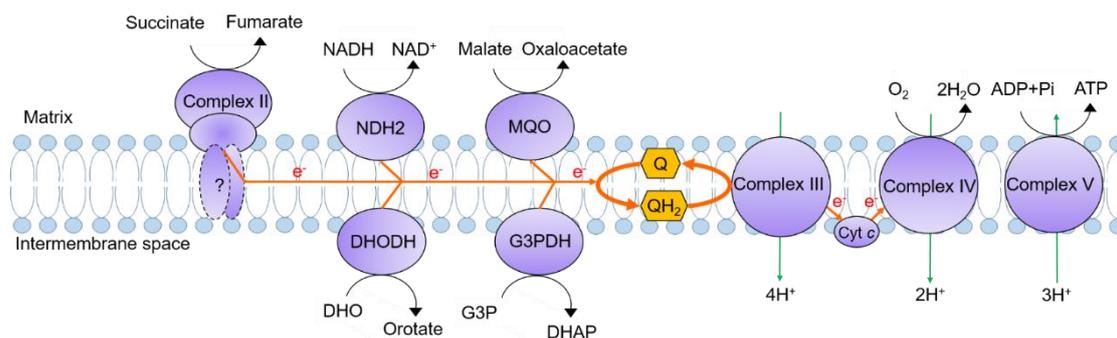


マラリア原虫はハマダラ蚊の吸血時に体内に侵入し、数分以内に肝臓に侵入する。肝細胞内で分裂、増殖しメロゾイトを形成し、肝細胞を破壊して血流内にメロゾイトを放出する(肝臓ステージ)。メロゾイトは赤血球に侵入し、赤血球内で無性生殖を行いリング、トロホゾイト、シizontを経て赤血球を破壊し、メロゾイトを放出して、これがまた次の赤血球に侵入する(赤内型ステージ)。赤内型の原虫の一部が、有性生殖世代である雌雄のガメトサイトとなり、蚊の吸血時に蚊体内に移動し、有性生殖を行う(蚊ステージ)。有性生殖後、原虫はスポロゾイトとなり、ハマダラ蚊の唾液腺に侵入して、吸血時にヒト体内に再び侵入し、新たな感染が成立する。図は <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> から引用・改変した。

図 3. ミトコンドリア電子伝達系
 (A) ヒトミトコンドリア電子伝達系



(B) マラリア原虫ミトコンドリア電子伝達系

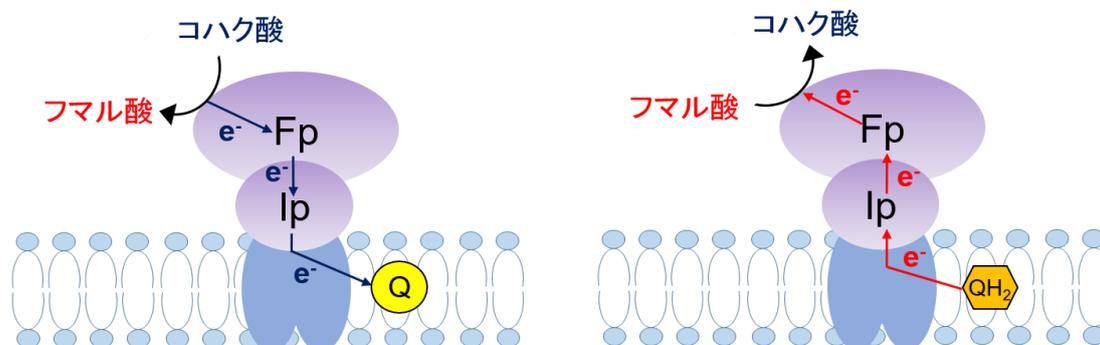


黄色は電子の流れ、緑色矢印はプロトン(H⁺)の流れを示す。マラリア原虫の膜アンカーサブユニット CybL と CybS は同定されていない。熱帯熱マラリア原虫は QOR、MDH、PRODH、ETFDH と複合体 I の遺伝子を欠損している。ヒトの遺伝子は MQO と NDH の遺伝子を欠損している。

図 4.複合体 II の機能

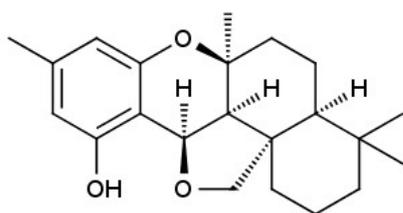
Succinate-quinone reductase (SQR)

Quinol-fumarate reductase (QFR)



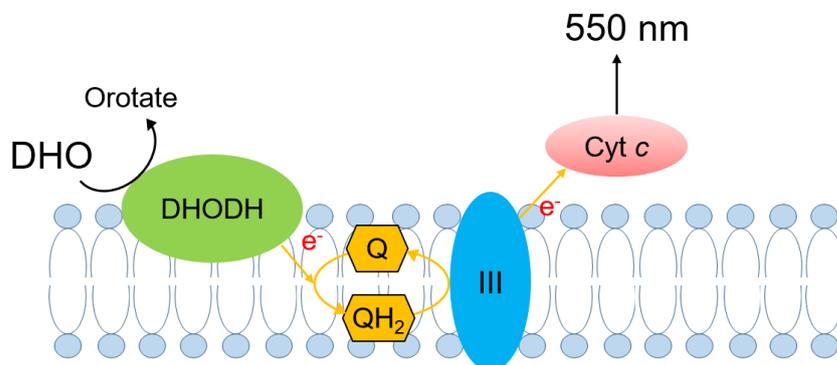
一般的に、複合体 II は Fp、Ip、膜アンカーサブユニットである CybL と CybS から構成される。TCA 回路のメンバーに属し、SQR 活性によりコハク酸をフマル酸に変換する時に電子をユビキノロンに受け渡す反応を触媒する。逆反応である QFR 活性はユビキノールから電子を受け取り、フマル酸をコハク酸に還元する反応である。膜アンカーサブユニットにユビキノロン結合部位があり、SQR と QFR 活性は膜アンカーサブユニットが必要である。熱帯熱マラリア原虫の SQR 活性が観察されることから、膜アンカーサブユニットは未同定だが、キノロン結合部位が存在すると考えられる。

図 5.シッカニンの構造



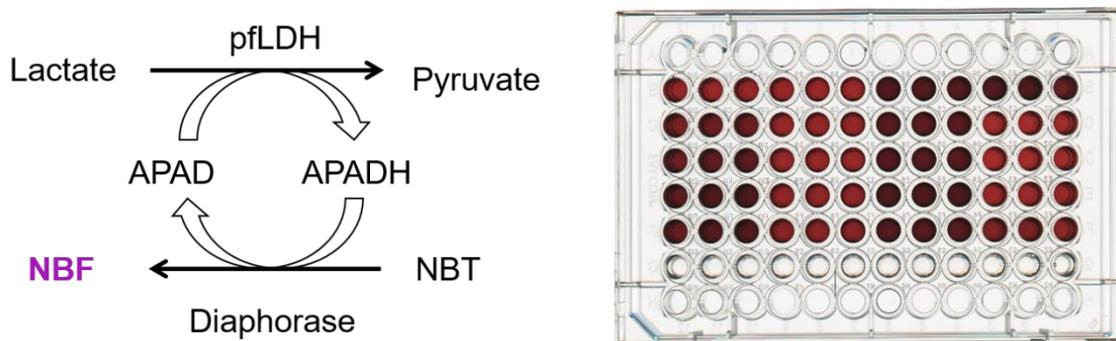
シッカニン

図 6. Dihydroorotate-cytochrome *c* reductase 活性の原理



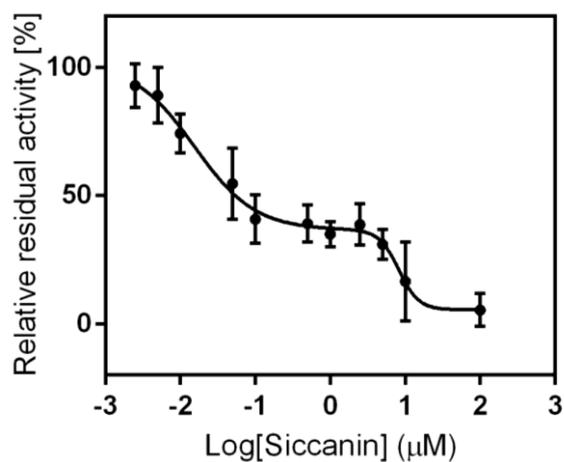
Dihydroorotate cytochrome *c* reductase 活性は DHODH と複合体 III による複合活性を測定する方法で、マラリア原虫の複合体 III の測定に利用される。Dihydroorotate(DHO)からの電子がユビキノン、複合体 III へと移動し、最終的に cytochrome *c* に伝達され、その cytochrome *c* の還元を 550 nm で測定する。

図 7. Lactate dehydrogenase(LDH)アッセイの原理



LDH アッセイはマラリア原虫の増殖阻害試験に利用される方法で、熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素である LDH により、lactate が pyruvate に変換されるときに、APAD を APADH に還元する。次に、Diaphorase により、APADH を APAD に再酸化すると同時に、NBT を紫色の NBF に変換する。NBF を 650 nm の波長で検出する(57)。

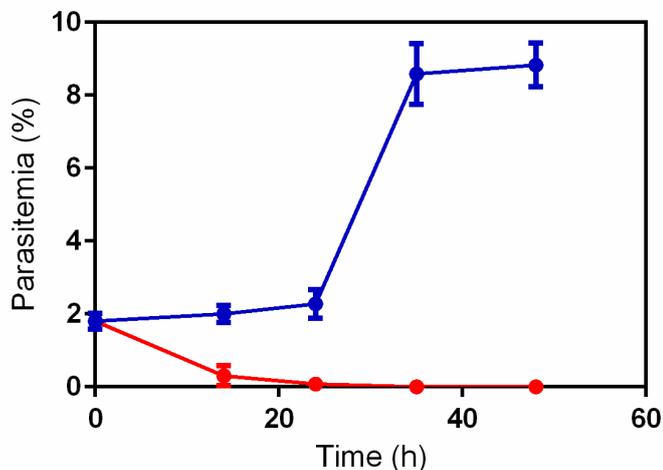
図.8 シッカニンによる succinate-ubiquinone reductase (SQR)活性の二相性阻害



熱帯熱マラリア原虫 3D7 から粗ミトコンドリア画分を調製し、SQR 活性を測定した。IC₅₀ は GraphPad Prism® ver.6.01.の biphasic method により求め、 $0.016 \pm 0.006 \mu\text{M}$ と $8.93 \pm 2.44 \mu\text{M}$ であった。データは平均 \pm SD を示す。

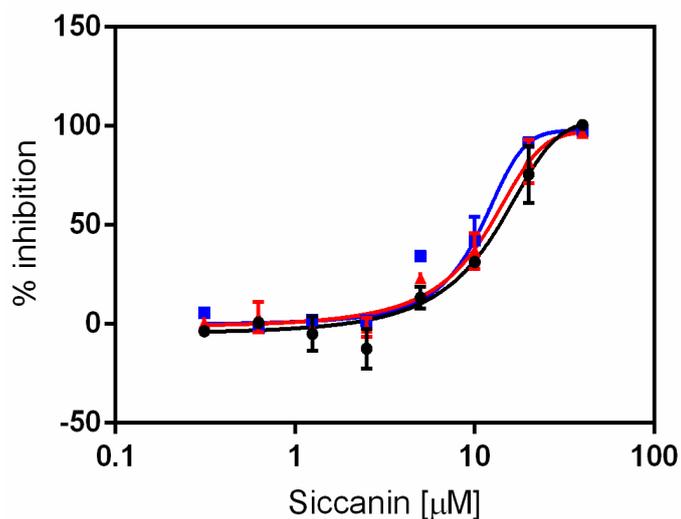
図 9. シッカニンによる熱帯熱マラリア原虫への阻害効果

(A) シッカニンによる熱帯熱マラリア原虫への影響



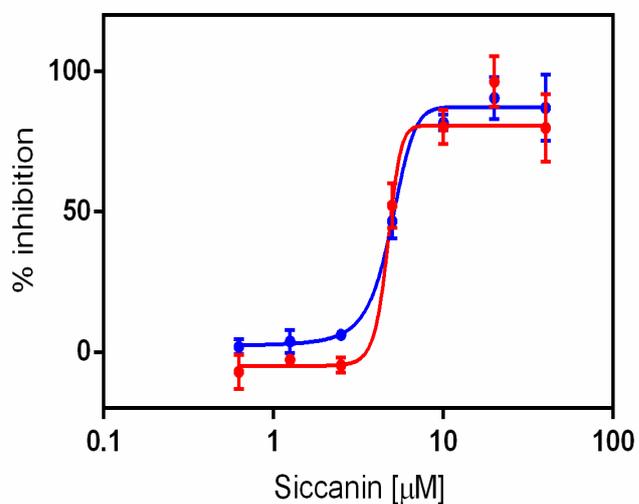
5 % (v/v)D-ソルビトール処理した熱帯熱マラリア原虫を終濃度 50 μM シッカニン存在下で培養し、16、24、36、48 時間ごとにギムザ染色により光学顕微鏡下で感染率を測定した。●は 0.1 % (v/v) DMSO、●は 50 μM シッカニンを示す。感染率の測定は $n=3$ で行った。

(B) 複合体 II の基質がシッカニンの阻害効果に与える影響



5 % (v/v)D-ソルビトール処理した熱帯熱マラリア原虫を各濃度シッカニン存在下で 72 時間、シッカニンのみ(●)、シッカニン+ 5 mM コハク酸ナトリウム(▲)、シッカニン+5 mM フマル酸ナトリウム(■)存在下で培養した。IC₅₀ はそれぞれ 8.40 ± 0.60 、 10.8 ± 2.16 と 11.5 ± 1.09 μM だった。

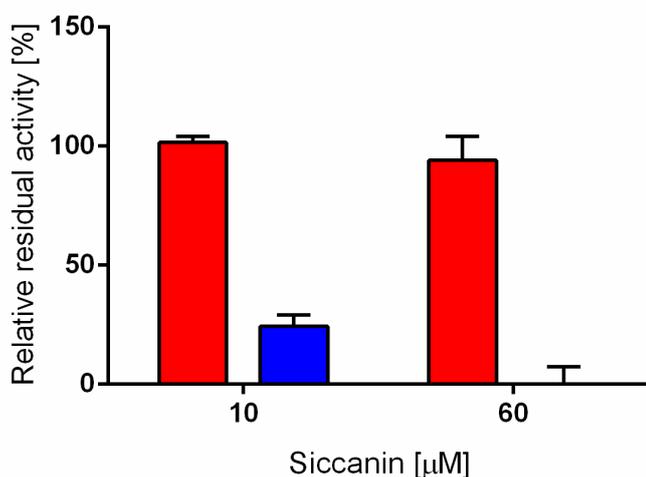
(C) $\Delta pfsdh$ 株に対するシッカニンの影響



複合体 II の Fp サブユニット遺伝子破壊株 ($\Delta pfsdh$) (●) と Fp サブユニット全長配列をもつ組換え株 (Full-length) (●) のシッカニンによる IC_{50} は、 6.10 ± 1.00 、 $6.13 \pm 0.91 \mu\text{M}$ だった。データは平均 \pm SD を示し、阻害率 (% inhibition) は LDH アッセイで測定した。

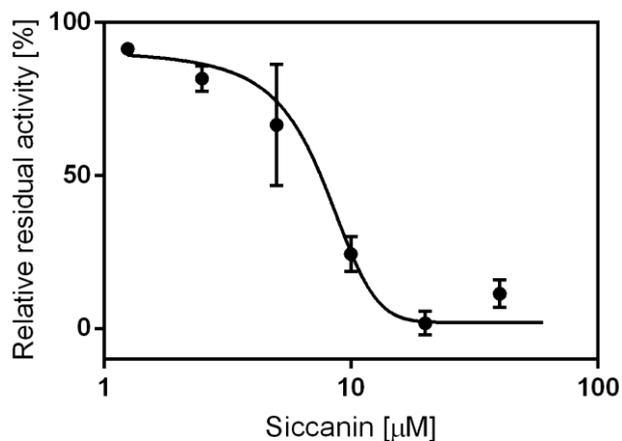
図 10. シッカニンによる複合体 III への阻害効果

(A) シッカニンの DHODH と dihydroorotate-cytochrome *c* reductase に対する阻害効果



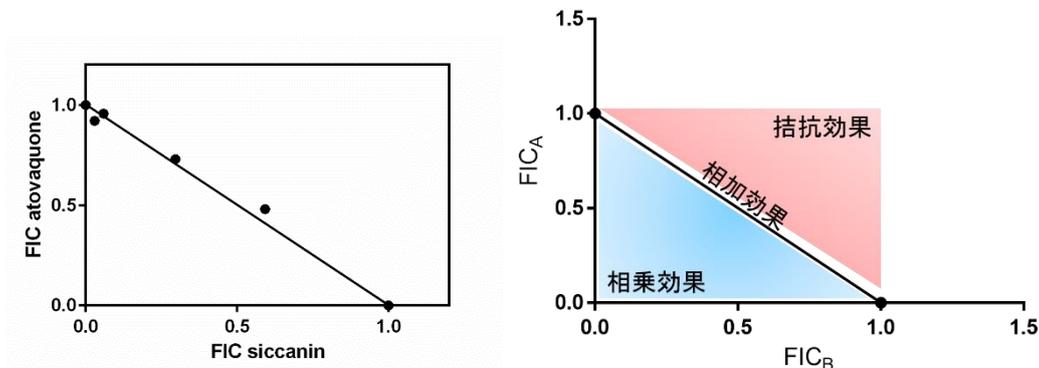
赤 : DHODH 活性、青: DHO-cyt *c* 活性を示す。

(B) シッカニンの Dihydroorotate-cytochrome *c* reductase に対する阻害効果



60 μM シッカニンは DHODH 活性を阻害しなかった。一方、シッカニンは濃度依存的に Dihydroorotate-cytochrome *c* reductase 活性を阻害し、その IC_{50} は $8.39 \pm 2.92 \mu\text{M}$ だった。データは平均 \pm SD を示している。

図 11.熱帯熱マラリア原虫に対するシッカニンとアトバコンのイソボログラム解析



イソボログラム解析は二つの薬剤の併用効果を検討する方法である。FIC (Fractional inhibitory concentration)により計算される(方法を参照)。CI (Combination index) >1 は拮抗効果で、 $CI=1$ は相加効果、 $CI<1$ は相乗効果を示す。イソボログラム解析により、シッカニンはアトバコンの熱帯熱マラリア原虫 3D7 株の阻害効果に、相加効果を与えた。CI値は 1.04 だった。