

論文の内容の要旨

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

マラリアは *Plasmodium* 属の原虫により引き起こされる寄生虫症で、WHO による World Malaria Report 2015 では、2014 年のマラリア患者は 2 億 1,400 万人、死者は 483,000 人と推定されている。マラリアに対する有効なワクチンは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組み合わせ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、アルテミシニンに対する薬剤耐性を獲得したマラリア原虫が出現したため、新規抗マラリア薬の開発が急務となっている。

マラリア原虫のエネルギー代謝は、宿主であるヒトと異なることから有望な薬剤標的と考えられている。マラリア原虫のミトコンドリア電子伝達系 (Electron Transfer Chain : ETC) はヒトの ETC とは大きく異なる。マラリア原虫の ETC は宿主であるヒトとは機能と構造が異なる 5 つのユビキノン還元酵素、2 型 NADH dehydrogenase (NDH2)、複合体 II (Succinate-ubiquinone reductase : SQR)、Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)、Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)、Malate-quinone oxidoreductase (MQO) と、これら酵素により取り出された電子を受け取る複合体 III (cytochrome *bc1* complex)、cytochrome *c* と複合体 IV から構成されている。臨床で使用されているマラロンの主成分であるアトバコンは複合体 III を標的としており、また DHODH と MQO はマラリア原虫の DNA と RNA 生合成のためのピリミジンとプリン生合成に必要な不可欠なため、格好の薬剤標的と考えられている。また、NDH2 は赤内型の原虫では遺伝子破壊が可能で原虫の増殖には必須ではないが、蚊体内の原虫で致死となるため伝播阻止薬の標的と考えられている。

本研究ではユビキノン還元酵素の 1 つである複合体 II に着目した。複合体 II は TCA 回路とミトコンドリア電子伝達系を直接結ぶ酵素である。複合体 II の遺伝子破壊株は赤内型の原虫の増殖遅延を引き起こし、さらに複合体 II は蚊体内の発育に必須であることが報告された。このため、複合体 II は伝播阻止薬の標的と考えられている。宿主であるヒトの複合体 II は 4 つのサブユニット、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 (CytbS) から構成されている。しかし、マラリア原虫では Fp、Ip サブユニットは同定されているが、膜アンカーサブユニットは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。さらに、マラリア原虫の複合体 II は既存の複合体 II の阻害剤であるマロン酸、TTFA、カルボキシシン、アトペニン A5 に対して感受性が低い。特に哺乳類、蠕虫、細菌の複合体 II の

キノン結合部位を nM オーダーで阻害するアトペニン A5 に対してもマラリア原虫複合体 II は約 1000 倍高い IC₅₀ を示す。このことから、マラリア原虫の複合体 II のユビキノン結合部位は他の生物と構造が大きく異なることが考えられる。このために、マラリア原虫複合体 II に対する阻害剤は見出されておらず、赤内型での複合体 II の必要性に関しても、ケミカルバイオロジーからの検証が行われていない。本研究では、マラリア原虫の複合体 II 特異的な阻害剤を探索し、阻害剤を利用して複合体 II の性質を明らかにすることである。そこで、注目した化合物はシッカニンである。シッカニンは *Helminthosporium siccans* から単離された化合物で、臨床ではすでに利用されており、真菌足白癬を引き起こす真菌である *Trichophyton mentagrophytes* の複合体 II を nM オーダーで阻害することが報告されている。また、シッカニンは哺乳類と大腸菌の複合体 II は阻害しないが、緑膿菌の複合体 II は nM オーダーで阻害する種特異的な阻害剤である。また、その阻害機構は複合体 II のユビ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。そこでこの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の粗ミトコンドリア画分を調製し、酵素レベルで調べた。

その結果、シッカニンは熱帯熱マラリア原虫の複合体 II を nM オーダーで阻害した。興味深いことに、その阻害は典型的な二相性阻害を示し、その IC₅₀ は 0.016 μM と 8.9 μM だった。これは、マラリア原虫の複合体 II がキノン結合部位を 2 つ持ち、succinate-quinone reductase(SQR)活性のほかに逆反応である quinol-fumarate reductase(QFR)活性を持つことを示唆している。シッカニンは他のユビキノン関連脱水素酵素(DHODH、MQO、G3PDH、NDH2)を阻害しなかったため、複合体 II 特異的であることが明らかとなった。

次にシッカニンによる熱帯熱マラリア原虫の増殖への影響を、培養系にて確認した。その結果、シッカニンは熱帯熱マラリア原虫に対して増殖を阻害し、その IC₅₀ は 8.0 μM だった。

シッカニンによる熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害が複合体 II の阻害に起因するのかを確認する目的で、二つの実験を行った。最初に、複合体 II の基質であるコハク酸、またはフマル酸による増殖阻害への影響を調べた。その結果、これら基質を添加してもシッカニンの増殖阻害効果は回復されなかった。次に、複合体 II の Fp サブユニットの遺伝子破壊株(Δ pfsdh 株)を用いてシッカニンの阻害効果を確認した。コントロールとして複合体 II の Fp サブユニットを持つ組換え株(Full-length 株)を用いた。その結果、Δ pfsdh 株と Full-length 株ではシッカニンによる増殖阻害の IC₅₀ に変化はなかった。この二つの結果により、シッカニンのマラリア原虫に対する薬剤標的は複合体 II ではなく、別の薬剤標的を持つと考えた。

マラリア原虫の ETC において赤内型の増殖に必要な不可欠な酵素が、DHODH、MQO と複合体 III である。シッカニンは DHODH と MQO を阻害しなかったため、シッカニンの薬剤標的は複合体 III であると考えられた。シッカニンが複合体 III を阻害するかマラリア原虫の複合体 III の評価系である Dihydroorotate-cytochrome *c* reductase 活性にて確認し

た。その結果、シッカニンは Dihydroorotate-cytochrome *c* reductase 活性を阻害した ($IC_{50}=8.4 \mu M$)。この結果から、シッカニンは複合体 II ではなく複合体 III し、熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害したと考えられる。

シッカニンは複合体 II だけではなく複合体 III も阻害するため、マラリア原虫の伝播阻止薬だけではなく、赤内型を標的とした抗マラリア薬としての可能性も出てきた。そこで薬剤開発の観点から、シッカニンの哺乳類ミトコンドリアの酵素に対する阻害について検討した。その結果、シッカニンはブタ由来のミトコンドリア複合体 II は阻害せず、複合体 III も $500 \mu M$ シッカニンでも阻害しなかった。また、シッカニンのヒト大腸がん由来細胞 (DLD-1) に対する IC_{50} は $34.2 \mu M$ で、選択性は 4.4 倍だった。これらの結果、シッカニンはマラリア原虫特異的な阻害剤であることが明らかとなった。

最後に、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ことで、熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害効果が増大するかイソボログラム解析を用いて検討した。その結果、マラリア原虫の ETC の酵素二つを同時に阻害すると、相加的に熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害することが明らかとなった。イソボログラム解析は、シッカニンとアトバコンは同じ電子伝達系を阻害しているが作用機序は異なることを示した。すなわち、赤内型で複合体 II が機能している可能性が示唆された。もう一つの可能性としては、複合体 III は二つのキノン結合部位、 Q_o 部位(quinol binding site)と Q_i 部位(quinone binding site)への結合の相違が考えられる。アトバコンは Q_o 部位に結合するが、シッカニンは複合体 III も阻害するため、 Q_o 部位ではなく Q_i 部位に結合する可能性も考えられる。

本研究の結果より、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シッカニンを見出した。そしてシッカニンを用いた解析により、熱帯熱マラリア原虫の複合体 II はキノン結合部位を二つ持ち、逆反応である QFR 活性を持つ可能性を示した。また、シッカニンはマラリア原虫の複合体 II だけではなく複合体 III を μM オーダーで阻害し、複合体 III を阻害することで熱帯熱マラリア原虫の増殖も阻害した。シッカニンは赤内型のマラリア原虫に必須である複合体 III だけではなく昆虫ステージで必須な複合体 II も阻害するため、新規抗マラリア薬及び伝播阻止薬として有望である。