

博士論文

論文題目 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II を標的とした
寄生虫薬の開発

氏 名 二橋 望

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II を標的とした
寄生虫薬の開発

指導教員

北 潔 教授

国際保健学専攻

平成 24 年度入学

41-127111

二橋 望

目次

第1章 序論

- 1-1 寄生虫感染症
- 1-2 トリパノソーマ科原虫
- 1-3 シャーガス病
- 1-4 アフリカ睡眠病
- 1-5 リーシュマニア症
- 1-6 トリパノソーマ科原虫症化学療法の実状
- 1-7 寄生虫のエネルギー代謝
- 1-8 ミトコンドリア呼吸鎖
- 1-9 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II
- 1-10 薬剤標的としての呼吸鎖複合体 II
- 1-11 *Trypanosoma cruzi* 由来ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II
- 1-12 論理的創薬のアプローチ
- 1-13 12 サブユニット呼吸鎖複合体 II の立体構造と薬剤開発
- 1-14 研究目的

第2章 非病原性トリパノソーマ科原虫 *Leishmania tarentolae* を用いた SQR 大量調製

- 2-1 目的
- 2-2 方法
- 2-3 結果
- 2-4 考察

第3章 トリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II 選択阻害剤探索

- 3-1 目的
- 3-2 方法
- 3-3 結果
- 3-4 考察

第 4 章 シッカニンのブタ回虫呼吸鎖複合体 II に対する阻害効果

4-1 目的

4-2 方法

4-3 結果

4-4 考察

第 5 章 総括と今後の展望

参考文献

謝辞

図表

略語

ATP: adenosine 5' - triphosphate

Cy**b**L: cytochrome *b* large subunit

Cy**b**S: cytochrome *b* small subunit

DCIP: 2,6-dichlorophenolindophenol

DDM: *n*-dodecyl- β -*D*-maltoside

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

FAD: flavin adenine dinucleotide

Fp: flavoprotein subunit

G3PDH: glycerol-3-phosphate dehydrogenase

hrCNE: high-resolution clear native electrophoresis

IC₅₀: 50 % inhibition concentration

Ip: iron-sulfur cluster protein subunit

LtSQR: *Leishmania tarentolae* SQR

MCD: maximal cell density

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2,4-tetrazolium bromide

NADH: nicotinamide adenine dinucleotide

NBT: nitroblue tetrazolium

PEG: polyethylene glycol

PMS: phenazine methosulfate

QFR: quinol:fumarate reductase

SDH: succinate dehydrogenase

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SML: sucrose monolaurate

SQR: succinate:quinone oxidoreductase

TAO: Trypanosome alternative oxidase

TCA: tricarboxilic acid

TcSQR: *Trypanosoma cruzi* SQR

YE: yeast extract

第 1 章 序論

1-1 寄生虫感染症

寄生虫感染症は多細胞性寄生虫によって引き起こされる蠕虫症と、単細胞性寄生虫による原虫症に分類される。これらの疾患は発展途上国を中心に大きな被害をもたらしており、WHO を始めとする国際機関が 2012 年に行ったロンドン宣言では、リーシュマニア症、シャーガス病、土壌伝播蠕虫症、リンパ管フィラリア症(象皮病)などの寄生虫感染症が顧みられない熱帯感染症 (Neglected tropical diseases: NTDs) として制圧目標に設定された。本研究は NTDs に分類される疾病であるトリパノソーマ症 (アフリカトリパノソーマ症、アメリカトリパノソーマ症、リーシュマニア症) 及び寄生性線虫症 (フィラリア症、回虫症など) に対するリード化合物探索を目的としている。トリパノソーマ症は全世界に約 4 億人の感染者がいる一方、有効なワクチンが存在せず、治療法は投薬による化学療法が主となっている。しかし現在用いられている薬剤の多くはいずれも強い副作用を持ち、生活環の特定のステージの原虫に対してしか効果を示さない場合が多い(1-3)。寄生性線虫症は主として畜産分野において問題となっているが、リンパ管フィラリアを始めヒトに対して重篤な慢性疾患を与えるものもある。現在用いられている駆虫薬は数十年前に開発されたものが主となっており、耐性株出現から新薬の開発が望まれている(4)。NTDs は主としてアジア、中南米、アフリカの発展途上国において分布しており、特にここで挙げたトリパノソーマ症と寄生性線虫症は感染地域が大きく重複している(図 1-1、1-2)。従って、両者に対する共通の新規治療薬が開発されれば、NTDs の制圧に対して大きな貢献すると考えられる。そこで本研究では、これら NTDs に対する共通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、特にこれまで行われてこなかったトリパノソーマ科原虫の複合体 II 阻害剤探索に主眼をおいた広い作用スペクトルの新規抗寄生虫薬の開発を目指した。

1-2 トリパノソーマ科原虫

トリパノソーマ科原虫はキネトプラスト目に属する絶対寄生性原虫群の総称で、哺乳類から植物まで幅広い種の生物を宿主とする。これらの中にはヒトへの感染性を示す種も存在し、発展途上国を中心に大きな社会的、経済的問題を引き起こしている。とりわけ影響力が大きいのは *Trypanosoma brucei*、*T. cruzi*、

そして *Leishmania* 属で、これらの原虫が引き起こす疾病は三大トリパノソーマ症と呼ばれる。*T. brucei* はアフリカ睡眠病の病原体で、2009 年には年間で 9876 例の感染が報告されているが、実際の感染者は 3 万人程度と推定される (WHO、2009)。*T. cruzi* はシャーガス病の病原で、その感染者は中南米を中心に 1000 万人と推定される (WHO、2010)。*Leishmania* 属は内臓リゅうシュマニア症、皮膚リゅうシュマニア症などの病原体で、感染者は東南アジアおよび中南米を中心に 3 億 5 千万人と推定されている(5)。

1-3 シャーガス病

T. cruzi はサシガメ *Triatoma* 種により媒介される人獣共通寄生虫で、ヒト、イヌ、ネコ、ブタなど 150 種を超える哺乳類を宿主とする(3)。*T. cruzi* は細胞の形態を変えながら宿主と媒介昆虫を行き来しており、その生活環は複雑である(図 1-3)。哺乳類宿主内では血液内型で増殖能を持たない trypomastigote、または細胞内型で増殖能を持つ無鞭毛の amastigote の形態を取り、昆虫内では増殖能を持つがヒトへの感染性を示さない epimastigote、または増殖能を持たずヒトへ感染する metacyclic trypomastigote の 4 つの形態を取ることが知られている。

ヒトへの主な感染経路は、吸血時のサシガメの糞からの皮膚感染と、原虫感染者からの輸血や母子間の胎盤感染である。ヒトに感染した *T. cruzi* が引き起こす疾病はアメリカトリパノソーマ症、またはシャーガス病と呼ばれ、感染からの時間経過に伴って 2 種類の症状を呈することが知られている。すなわち感染初期の急性期と、感染後 10~30 年経過時に現れる慢性期である。

急性期の主な症状は心筋炎、髄膜脳炎、感染部位の炎症およびシャゴーマと呼ばれる皮膚結節で、サシガメを介する感染では感染から 1~2 週間程度、輸血による場合では 1 ヶ月ほどで発症する。初期症状は皮膚の炎症で、この間の投薬治療により患者の 50~80 %は完治するが、5~10 %ほどは 4~8 週間で心筋炎、髄膜脳炎を併発し死に至る。残りの 10~30 %は炎症の終息後 10~30 年間を無症状のまま過ごし、やがて症状の重篤な慢性期へ移行する(3)。慢性期の主要な症状は心臓肥大などの心疾患や巨大結腸症で、四肢の麻痺といった重篤な障害を伴い、最終的には死に至る。

1-4 アフリカ睡眠病

アフリカトリパノソーマ症(アフリカ睡眠病)は、主としてサハラ砂漠以南のアフリカにおいて症例が報告されている致死性の熱帯感染症である。1998年には年間50万人の罹患者が存在し、その後は患者数の減少が見られたものの、2006年においても年間10万人を超える感染者が報告されている(1)。病原体は*Trypanosoma brucei*種で、アフリカ中央部及び西部で見られる*T. b. gambiense*、東部および南部で見られる*T. b. rhodesiense*、そして主としてヒト以外に感染する*T. b. brucei*の3つの亜種に分類される。媒介昆虫はツェツェバエ *Glossina* 属で、約20種がこれまでに報告されている。原虫の生活環は昆虫内ステージと宿主内ステージに分けられ、さらに宿主内では分裂能のあるスレンダー型、細胞分裂しない中間型およびスタンピー型の3種に分類される(図1-4)。宿主内ステージの原虫は血流中で分裂及び生育し、血液脳関門の透過能を有している。症状は感染直後から始まる第一期(リンパ期)と発展型の第二期(髄膜脳炎期)からなり、第一期の主症状は発熱、頭痛、掻痒症およびリンパ腺症、第二期の主症状は睡眠障害と神経障害である。このうち第二期は致死性であり、*T. b. gambiense*ではおよそ三年で患者が死亡する一方、病状進行が早い*T. b. rhodesiense*では感染後数週間から数ヶ月で死に至る。また、*T. b. brucei*は家畜にナガナ症と呼ばれる致死性の疾病を引き起こし、流行地域の畜産業に大きな被害を与えている。

1-5 リーシュマニア症

リーシュマニア症は中南米やアフリカ、インドやバングラディシュといったアジアに分布する寄生虫感染症である。サシチョウバエによって媒介され、全世界に3億5千万人の感染者がいると推定される(5)。リーシュマニア症は皮膚リーシュマニア症(*L. tropica*、*L. major*、*L. infantum*、*L. aethiopica*、*L. mexicana*)、粘膜リーシュマニア症(*L. braziliensis*、*L. major*)、内臓リーシュマニア症(*L. donovani*)に分類され、このうち内臓リーシュマニアは内臓肥大を伴う致死性の疾病である。媒介昆虫内においてリーシュマニアは鞭毛を有するpromastigote型で存在しているが、宿主体内へ感染後は血流を通じてマクロファージへと侵入し、そこで鞭毛を持たないamastigote型として増殖する(図1-5)。

1-6 トリパノソーマ症化学療法の現状

1-5 までで述べたように、トリパノソーマ科原虫症はアフリカ睡眠病、シャーガス病、リーシュマニア症からなる熱帯病の総称で、それぞれに対して対抗薬剤が異なっている。現在用いられている薬剤はいずれも副作用が強い、耐性株が出現しているなどの問題があり、新規薬剤の開発が求められている。以下、各トリパノソーマ症に対する化学療法の現状を述べる。

1-6-1 アフリカ睡眠病

アフリカ睡眠病の主要な治療薬はスラミン、ペンタミジン、メラルソプロール、エフロルニチンである(1, 6)。これらはいずれも強い副作用を有する薬剤で、全てのものに耐性株が存在する。またスラミンは*T. b. rhodesiense*の感染初期、ペンタミジンは*T. b. gambiense*感染初期のみ効果を示し、感染後期の脳関門通過後の原虫に効果を示すのはメラルソプロールとエフロルニチンである。しかしエフロルニチンは*T. b. rhodesiense*には効果を発揮せず、*T. brucei*両種の後期型に効果を示すのは極めて副作用の重篤なメラルソプロールのみとなっている。スラミンは4つのベンゼン環と2つのナフタレン環を骨格に持つ負に帯電した高分子化合物で、1922年に発見されて以来*T. b. rhodesiense*に対する選択薬として用いられているが、その作用メカニズムはわかっていない(7)。原虫細胞への取り込みは受動輸送輸送による膜透過に加え、低比重リポタンパク(LDL)の結合による能動輸送機構も示唆されているが、これに反する知見も報告されており(8)、実際のスラミンの代謝については明確なメカニズムはわかっていない。ペンタミジンは2つのジアミン基を持つ正に帯電した芳香族化合物で、DNAに対して結合能を持つ(9)。この化合物の作用機序も完全にはわかっていないが、標的の一つは原虫ミトコンドリアのDNAトポイソメラーゼIIとされ、投与された原虫ではミトコンドリアの消失が報告されている(10)。細胞への取り込みはジアミントランスポーターのP2アミノプリンパーミターゼ(AT1)を介する他(11)、ペンタミジン選択的なトランスポーター(PT)も存在する一方(12)、原虫内におけるミトコンドリアへの輸送経路はわかっていない。メラルソプロールは*T. b. gambiense*と*T. b. rhodesiense*の両方に効果を発揮する薬剤であるが、疎水性が強いいため血液への溶解性が低く、副作用も極めて重篤で投与患者の5%が薬剤の毒性により死亡している(13)。作用機序と取り込み機構は不明であるが、AT1の変異株がメラルソプロール耐性を示すことから、細胞への薬剤の侵入はペンタミジンと部分的に共通していることが示唆される(14)。エフロルニチンは1980年台に実用化された比較的新規の薬剤で、後期型睡眠病の昏睡状態に大きな効果を示すが、脳関門の通過性が低いため高濃度での投与が必要である。この薬剤はアフリカ睡眠病治療薬で唯一作用機序がわかっている化合物で、脂肪酸代

謝経路のオルニチン酸デカルボキシラーゼの阻害剤として働く。一方で、薬剤の細胞への取り込み機構についてはいまだ解明されていない(6)。

1-6-2 シャーガス病

シャーガス病の主な治療薬はベンズミダゾールとニフルチモックスの2種類のみであるが(3)、共に感染後期の *T. cruzi* に対して効果が低く、副作用も強い。うえに耐性株の出現も報告されている(15)。これらは共にニトロ複素環化合物で、原虫細胞内ではプロドラッグとして働くことが知られている。作用機序の解明は主にニフルチモックスにおいて進んでおり、細胞内に取り込まれた薬剤は原虫ミトコンドリア局在性の NADH 依存的 I 型硝酸還元酵素で代謝され、その過程で生じる活性酸素がミトコンドリア DNA を破壊することが示唆されている(16)。一方でベンスミダゾールは比較的作用機序の解明も行われておらず、またニトロ複素環化合物の原虫細胞への取り込み機構も分かっていない。これらの背景から、新規シャーガス病治療薬の開発はとりわけ急務となっている。

1-6-3 リーシュマニア症

リーシュマニア症の主な治療薬は内臓リーシュマニア症および皮膚リーシュマニア症で共通しており、アンチモン系化合物であるペントスタンやメグルチンアンチモネート、ポリエン化合物のアンホテライシン B、そして唯一の経口摂取薬剤であるミルテホシンが知られている(5, 17)。これらに加え、近年はアミノキノリン化合物であるシタマキン(18)がリーシュマニア症経口薬として注目されている。これらのうち、アンチモン系化合物は現在のリーシュマニア症第一選択薬であるが、副作用が強く作用機序の解明も進んでいない。うえ、薬剤耐性株が出現している(17)。アンホテリシン B は抗菌剤として知られていた比較的高価な化合物で、強い副作用を伴うためリポソームと併用することで薬剤の毒性を抑える手法が見出されている(19)。この化合物は原虫細胞膜表面に特異的に存在するステロール化合物のエルゴステロール等に結合することで細胞膜を破壊することが知られている(20)。ミルテホシンは静脈注射に依らない経口摂取によるリーシュマニア症薬剤であるが、他の薬剤と同様に薬剤耐性株が出現している(21)。原虫のプロテインキナーゼ B を第一標的とする標的とすることが示唆されているが(22, 23)、その他にミトコンドリア呼吸鎖に対する阻害効果も見出されている(24)。

1-7 トリパノソーマ科原虫のエネルギー代謝

その複雑な生活環に対応して、トリパノソーマ科原虫は特殊なエネルギー代謝経路を持つことが知られている。例えばアフリカ睡眠病の病原体 *T. brucei* においては、媒介昆虫であるツェツェバエ内では解糖系、TCA 回路、ミトコンドリア呼吸鎖を用いて酸化リン酸化によって ATP を産生するが、ヒトの血液中においては解糖系のみが働いて、いわゆる哺乳類型のミトコンドリア呼吸鎖は消失する(28)。この血流型 *T. brucei* は、解糖系によって生じる NADH の再酸化をも *T. brucei* 固有のシアン耐性末端酸化酵素 Trypanosome alternative oxidase (TAO) の働きにより行っている(29)。TAO に対する阻害剤アスコフラノン(30)は虫体の増殖を nM オーダーで阻害することがわかっており、アフリカ睡眠病治療薬として実用化に向けた取り組みが当研究室でなされている(30)。

T. cruzi やリーシュマニア属原虫の場合、*T. brucei* と違ってステージ間のエネルギー代謝の変化は少ないが、哺乳類と比べてグルコース代謝経路の制御が不完全で、酢酸、コハク酸、エタノール、ピルビン酸などを最終代謝産物として生産する(28, 31, 32)。トリパノソーマ科原虫においては解糖系の 7 つの酵素が細胞質ではなくグリコソーム(33)と呼ばれるペルオキシゾーム由来細胞小器官に局在している。原虫細胞に取り込まれたグルコースは、グリコソームでホスホエノールピルビン酸(PEP)に変換されるが、ここで生じた PEP は一部がピルビン酸となってミトコンドリアへと運ばれ、一部はグリコソーム内で TCA 回路を経ずにフマル酸に変換される。このグリコソーム内で生じるフマル酸は一部が TCA 回路に取り込まれるが、一部はフマル酸還元酵素によってグリコソームの NADH 再酸化に共役され、コハク酸へと酸化される。ミトコンドリア呼吸鎖複合体は全て発現しているものの、複合体 I が十分に機能しているかには議論があり(34, 35)、単一サブユニットで構成される NADH-ユビキノン酸化還元酵素 NDH2 が主に NADH からキノンへの電子伝達を触媒している(36)。

1-8 ミトコンドリア呼吸鎖

ヒトを含む多くの生物において、好氣的条件下のエネルギー代謝でミトコンドリア呼吸鎖は重要な役割を果たしている。ミトコンドリア呼吸鎖は複合体 I~IV の 4 つの膜タンパク質複合体から構成されており(図 1-6)、真核生物ではミトコンドリア内膜に、原核生物では細胞膜に局在している。

全体の反応としては、解糖系と TCA 回路中で生じた NADH から複合体 I が、コハク酸から複合体 II が電子を奪い、膜内に存在する疎水性の低分子伝達体であるキノンをキノールへと還元する。キノールは複合体 III によりキノンへ再酸化され、電子を酸化型シトクロム *c* に伝達する。還元されたシトクロム *c* は末端酸化酵素の複合体 IV により酸化され、複合体 IV は最終電子受容体である酸素を水に還元する。この過程で複合体 II 以外の呼吸鎖複合体がプロトンポンプとして働き、膜の内側と外側の間にプロトン濃度勾配を形成する。このプロトン濃度勾配の自由エネルギーを利用して、最終的に複合体 V が ATP を合成する。

1-9 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II はミトコンドリア呼吸鎖を構成する酵素の一つで、コハク酸の還元力を利用して細胞の ATP 産生に寄与するコハク酸-キノン酸化還元酵素(SQR)と、その逆反応を行うキノール-フマル酸酸化還元酵素(QFR)の二種類が存在する(37, 38)。

SQR は呼吸鎖の構成成分であると共に、TCA 回路中で唯一の膜局在性タンパク質である。他の呼吸鎖の酵素複合体とは異なり、プロトンポンプを行う機能が存在しない(39)。触媒としてはコハク酸をフマル酸へと酸化し、そこで得た電子でキノンをキノールへと還元する。ヒトを含む多くの生物において SQR のサブユニットは 4 つで、親水性の Fp (SDH1)と Ip (SDH2)、そして疎水性の CybL (SDH3)と CybS (SDH4)がそれにあたる。Fp はコハク酸およびフマル酸結合部位を含むサブユニットで、補欠分子族として FAD を共有結合している。コハク酸酸化で得られた電子は、3 種の鉄硫黄クラスターを含む親水性サブユニット Ip にリレーされ、最終的にキノンへと受け渡される。残る CybL と CybS はヘム *b* を含む疎水性タンパク質で、膜へのアンカーの役割を果たし、また Ip と共にキノン結合部位を構成する。

QFR は SQR と同様のサブユニット構造を持つが、こちらはキノールをキノンに酸化しつつフマル酸をコハク酸に還元する。この QFR は生物の低酸素環境への適応にしばしば重要な役割を果たすことが知られている。例えばある種のがん細胞においては低酸素ストレスへの対応に関与し、回虫などの蠕虫においては低酸素環境におけるエネルギー代謝に関わっている(40)。

1-10 薬剤標的としての呼吸鎖複合体 II

呼吸鎖複合体 II は TCA 回路と呼吸鎖を直接結ぶ酵素であり、重要な薬剤標的の一つでもある。古くから農薬として知られていた抗菌剤カルボキシシン(41-43)は代表的な複合体 II のキノン結合部位阻害剤であり、フルトラニル(43)、フルオピラム(44)といった近年の有望な農薬候補の一部も呼吸鎖複合体 II を標的とすることが分かってきている。また 1-9 で触れたように回虫を始めとする蠕虫の一部は、宿主環境内における低酸素状態に適応するため QFR を嫌氣的エネルギー代謝に用いており、その生存に呼吸鎖複合体 II が大きな役割を果たしている(45)(4 章)。回虫と同様、トリパノソーマ科原虫も昆虫内と哺乳類宿主体内という異なった生育環境を生活環で経験し、1-7 で述べたようなダイナミックなエネルギー代謝系の切り替えを行う。また、呼吸鎖複合体はトリパノソーマ症の一つであるリーシュマニア症において重要な薬剤標的であり、抗原虫作用を示すミルテホシン(呼吸鎖複合体 IV)(24)、タフェノキン(呼吸鎖複合体 III)(46)、シタマキン(呼吸鎖複合体 II)(47)といった化合物が呼吸鎖酵素を標的の一つとする事が示唆されている。また、*T. cruzi* の宿主細胞への侵入が呼吸鎖複合体 III の阻害剤アンチマイシン A によって阻害される知見も報告されている(48)。一方で、リーシュマニア以外のトリパノソーマ科原虫の薬剤で呼吸鎖複合体を標的としたものは見つかっておらず、呼吸鎖複合体全般が原虫の生存にどの程度関わっているかは明白ではない。中でも呼吸鎖複合体 II の原虫内における生理的役割はほとんど分かっておらず、最近までその酵素学的な知見自体がほぼ得られていない状況であった。

1-11 *T. cruzi* 由来ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II

2009 年、これまで明らかでなかったトリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II の性質を解析するため、当研究室において *T. cruzi* 由来の SQR(TcSQR)の精製と生化学的解析が行われた(49)。その結果、TcSQR が合計 12 のサブユニットから構成され、かつ Ip サブユニットが遺伝子レベルで 2 つに分断されていることが明らかになった。そしてゲノム解析の結果から、新たに見つかった TcSQR 全オルソログがトリパノソーマ科原虫全体で保存されていることを見出した(49-52)。これまでに 4 つ以上のサブユニットをもつ SQR は報告されており、例えば植物由来の SQR は Fp、Ip、CybL、CybS の他に 4 つの非触媒サブユニ

ットを有している(53)。しかし、コハク酸-キノン間の電子リレーに直接関与する Ip サブユニットが遺伝子で分断されている構造は例がなく、サブユニット数においても TcSQR は既知の呼吸鎖複合体 II 中で最大である。また、基質および一般的な阻害剤に対する感受性も哺乳類由来の SQR より顕著に低く、TcSQR の基質結合部位周辺のアミノ酸の配置が極めて特殊である可能性が示唆された。この解析においては、12 サブユニット呼吸鎖複合体 II に対する選択的な阻害剤が見つからず、呼吸鎖複合体 II の阻害がトリパノソーマ科原虫の生存に与える影響を調べる事が出来なかった。また、寄生虫特異的なサブユニットが基質の認識や触媒機能に与える影響もわかっていない。これは *T. cruzi* の大量培養の困難さとミトコンドリア収率および TcSQR 精製効率の低さから、阻害剤の探索と立体構造解析が行えなかったためである。しかし TcSQR の酵素構造の特殊性は、次節で述べる論理的創薬アプローチにおいて潜在的に副作用の少ない化合物を探索するのに極めて有用な特徴である。1-6 で述べたように、*T. cruzi* を病原体とするシャーガス病にかぎらず、トリパノソーマ科原虫症に対する化学療法は十分ではなく、新規薬剤の開発が強く求められている。とりわけ既存の薬剤への耐性株が蔓延していることを考慮すると、これまで薬剤標的として着目されていなかった呼吸鎖複合体 II の阻害剤探索は新規な作用機序を持った薬剤の開発につながる可能性がある。

1-12 論理的創薬のアプローチ

感染症病原体に対する論理的創薬(rational drug design)(54-56)においては、まず病原体の生存に重要な役割を果たす酵素を見出し、それに対する阻害剤の探索を行う。既存の薬剤に耐性株が出現して新たな作用機序の化合物が必要とされ、かつ有望な新規薬剤標的酵素が判明している場合、この方法はランダムスクリーニングより効率的にリード化合物を探索できると考えられる。薬剤候補となる阻害剤は、副作用の観点からヒトに対する影響を最小限に抑える必要がある。そこで、論理的創薬で標的となる病原体酵素はヒトにおいて存在しないか、ヒトのオルソログと大きく構造が異なっているのが望ましい。この選択的阻害剤の設計にあたっては、標的酵素の立体構造解析が重要な役割を果たす。すなわち、病原体の酵素に対してより親和性が高く、ヒトの酵素へより結合力の低い化合物を発見するため、酵素間の立体構造を比較し、病原体に固有の化

合物結合領域を探していく。この立体構造に基づく論理的創薬(Structure based drug design: SBDD)における阻害剤探索の一例として、当教室で行われてきた呼吸鎖複合体 II を標的とする抗回虫薬の開発を示す。

回虫呼吸鎖複合体 II の解析においては、試料の調製が比較的容易なブタ回虫 *Ascaris suum* 成虫をモデルに酵素大量精製と X 線結晶構造解析を行った。この時行われた酵素と基質あるいは阻害剤との複合体に対する解析により、*A. suum* の呼吸鎖複合体 II のキノン結合部位には Ip サブユニット、CybL サブユニット、CybS サブユニットからなる固有の疎水性ポケットが存在することが判明した(57, 58)。そして並行して行われた生化学的解析によって、抗菌剤フルトラニルが回虫呼吸鎖複合体 II に対してブタ呼吸鎖複合体 II の 9000 倍の阻害効果を示すこと、さらにフルトラニルの炭素環状構造から伸びる側鎖が回虫酵素特異的な疎水性ポケットと相互作用していることが明らかになった(図 1-7)(38, 57, 58)。この知見を利用し、疎水性ポケットの奥に側鎖を伸ばす形でフルトラニル誘導体を設計し、より選択性の高い化合物の探索を行ってきた。ここで発見された化合物については、現在ドイツのバイエル薬品社と共同で *in vivo* での動物実験が進行中である(未発表)。

1-13 12 サブユニット呼吸鎖複合体 II の立体構造と薬剤開発

1-11 で述べたように、トリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II は特殊な基質触媒部位構造を有すると考えられ(49)、この酵素が論理的創薬における選択的阻害剤探索に適する可能性が示唆される。このため、12 サブユニット SQR の立体構造を解析することは、基礎科学のみならず薬剤開発の観点からも重要である。しかし現在、原虫特異的サブユニットの機能と酵素全体の立体構造の解析は行われていない。また、この複合体 II 自体がトリパノソーマ科原虫で果たしている生理的役割についても、現時点では報告がなされていない。1-11 でも触れたように、これらの原因の一つは、トリパノソーマ科原虫の呼吸鎖複合体 II の効率的な大量調製法が確立せず、立体構造解析やスクリーニングを効率的に行うことが出来ないためである。ネイティブな 12 サブユニット呼吸鎖複合体 II の大量精製は、我々の知る限り当研究室で行われた TcSQR の精製(49)が唯一のものであるが、ここで得られた精製標品は 10L 培養当たりから 150 µg 程である。これまで呼吸鎖複合体 II の X 線結晶構造解析は数多く行われており、SQR では

Escherichia coli や鳥類 *Gallus gallus*(59, 60)、ブタ(61)など、QFR では *E. coli*(62)、*Wolinella succinogenes*(63)、*Rhodospirillum rubrum*(64)などのバクテリアや豚回虫 *A. suum* で立体構造が報告されている。これらは全て 3 または 4 サブユニットの呼吸鎖複合体 II であるが、通常数 mg~数十 mg の試料が構造解析に必要とされており、より複雑な 12 サブユニット SQR の構造解析を現在の TcSQR 精製法で行うのは現実的ではない。また、現時点で呼吸鎖複合体 II の組み換えタンパク質発現系の構築は報告されておらず、バクテリア等のベクターを用いた 12 サブユニット SQR の過剰発現も困難である。そこでトリパノソーマ科原虫 SQR を詳細に解析するには、より簡便にネイティブな原虫酵素を調製するための系が必要となる。

1-14 研究目的

本研究の主要目的は、X 線結晶構造解析を念頭に原虫複合体 II の効率的な精製法を開発すると共に、阻害剤スクリーニング系を構築して原虫 SQR の選択的阻害剤を発見し、複合体 II 阻害剤がトリパノソーマ症治療薬となり得るかのケミカルバリデーションを行うことである。研究の第一段階では、培養の容易な非病原性トリパノソーマ科原虫 *Leishmania tarentolae* に着目し、原虫ミトコンドリアの大量調製法、及び *L. tarentolae* 呼吸鎖複合体 II (LtSQR) の大量精製法の確立を目指した(2 章)。第二段階では、LtSQR のサブユニット構成をタンパク質レベルで TcSQR と比較し(2 章)、さらに LtSQR と病原性トリパノソーマ科原虫由来 SQR の阻害剤感受性を比較することで(3 章)、LtSQR をモデルとして 12 サブユニット SQR の阻害剤探索を行うことの妥当性を検証した。第三段階では、当研究室で構築中のキノン結合部位阻害剤ライブラリーを用いて、LtSQR に対する阻害剤スクリーニングを行った(3 章)。その結果、抗真菌剤であるシッカニンで強い LtSQR の選択的阻害効果を見出したので、この化合物の病原性トリパノソーマ SQR に対する酵素活性阻害の測定、シッカニンの酵素阻害様式の決定、及び *in vitro* における化合物の抗原虫効果を測定した(第 3 章)。ここで、シッカニンが線虫 *C. elegans* に対して発達阻害効果を示すこと、寄生性線虫においても呼吸鎖複合体 II が重要な薬剤標的であること、そしてトリパノソーマ症と寄生性線虫症が重複した分布域を有することから、寄生性線虫のモデル生物であるブタ回虫呼吸鎖複合体 II に対するシッカニンの阻害効果を調べた。(第

4 章)。

第2章 非病原性トリパノソーマ科原虫 *L. tarentolae* を用いた SQR 大量調製

2-1 目的

1 章で述べたように、病原性トリパノソーマ科原虫 *T. cruzi* の呼吸複合体 II (SQR)は宿主である哺乳類の SQR より 8 つサブユニットが多く、哺乳類 SQR に対する一般的な阻害剤に対して感受性を示さない。このことは、*T. cruzi* SQR (TcSQR)基質結合部位周辺の構造が哺乳類と異なること、そして理論的には原虫 SQR 特異的な阻害剤が存在する可能性を示している。しかし現在見出されている *T. cruzi*を用いたトリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II 調製法は収率が低く、論理的創薬で重要な X 線結晶構造解析等の mg 単位の酵素が必要な実験に用いるのは困難である。さらに *T. cruzi*は液体培地中での対数増殖期における倍加時間が 58 ± 13 時間(CL Brener 株 epimastigote)(65)と長く、増殖と同時にヒトに感染性を示す metacyclic trypomastigote の割合が培養液中に増加する上に、大規模スクリーニングに使用するミトコンドリアの大量調製も効率的に行えない。一方で、ゲノム解析の結果は、TcSQR の各サブユニットのオルソログがリーシュマニア属やトリパノソーマ属を含むキネトプラスチドのゲノム全体で保存されていることを示している。そこで本研究では、取り扱いの容易な非病原性のリーシュマニア属原虫 *L. tarentolae* をモデルとして用いた SQR 大量精製系の開発を行った。

L. tarentolae はヤモリに感染する非病原性の原虫で、トリパノソーマにおける RNA 修飾 (66, 67) に関する研究でモデル生物として用いられてきた。真核生物の組み換えタンパク質発現ベクターとしても注目され、大量培養条件の検討をなされている他(68)、近年では抗リーシュマニア症治療薬の一次スクリーニングのモデルとしても利用され始めている(69-72)。本研究に先立ち、当研究室で次世代シーケンサーを用いた *L. tarentolae* 全ゲノム配列の解析が行われた。その結果 TcSQR の全オルソログは *L. tarentolae* においても保存されており、かつ *L. tarentolae* SQR (LtSQR)全オルソログは複数種の病原性トリパノソーマとの間で高い同一性を示すことが見出された(表 2-1)。以上の結果は、*L. tarentolae* が 12 サブユニット SQR の解析を行う上で良いモデルとなる可能性を示している。そこで本章では、LtSQR の生化学的性質を明らかにし、さらにトリパノソーマ SQR 構造解析のモデルとして使用可能か検討するため、LtSQR の大量精製法確立を目指すとともに、LtSQR のタンパク質レベルでのサブユニット解析を行った。

2-2 方法

2-2-1 *L. tarentolae* 大量培養

L. tarentolae T7-TR 株(Jena Bioscience)を YE 培地(68)(24 g/L Bacto Yeast Extract, 71 mM K_2HPO_4 , 17 mM KH_2PO_4 , 50 U/mL ペニシリン、50 μ g/mL ストレプトマイシン、10 μ g/mL ヘミン、100 μ g/mL ハイグロマイシン B)中で培養し、26°C で細胞密度 1.0×10^8 /mL (後期対数増殖期)まで 3 日間の好氣的培養を行った(LTI-600SD、EYELA)。続いて、培養原虫を 100 mL の YE 培地に細胞密度 1.0×10^6 /mL となるよう懸濁し、再度 26°C で後期対数増殖期まで 3 日間の好氣的培養を行った。この培養液の一部を 1 L 培地に細胞密度 1.0×10^6 /mL となるよう懸濁し、26°C で後期対数増殖期まで 3 日間、100 rpm で好氣的に培養した(G BR-300、TAITEC)。その後、1 L 培地を新たな YE 培地 10 L と混合し、大量培養用ファーマンター-BIOFLO2000 (New Brunswick)を用いて 26°C で 2 日間、200 rpm で好氣的に培養した。細胞密度 $\sim 2 \times 10^8$ /mL (早期定常増殖期)で原虫細胞を回収し、2,000 $\times g$ 、4°C、30 分間の遠心分離で沈殿した後、細胞懸濁液 A [20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0), 150 mM NaCl, 20 mM グルコース]に懸濁した。これを 3 回繰り返した後、得られた沈殿物を必要最少量の細胞懸濁液 B (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM スクロース, 1 mM マロン酸ナトリウム, 0.2 mM オロト酸ナトリウム, 0.5 mM EDTA, 沈殿 20 g あたり 1 ビン(全量 10 mL)の Protease inhibitor cocktail for general use (Sigma Aldrich))]に懸濁し、液体窒素で冷凍後、使用まで-80°C で保存した。

2-2-2 *L. tarentolae* ミトコンドリア画分調製

すべての操作は 4°C で行った。2-2-1 で得られた標品を氷上で穏やかに解凍し、圧力 75 MPa でフレンチプレス破碎処理を行った。得られたホモジェネートは 1,000 $\times g$ で 30 分間(ミトコンドリア画分)の遠心を行い、沈殿物を ~ 60 mg タンパク質/mL の濃度で細胞懸濁液 B に懸濁した。各画分は SQR 活性測定とタンパク質定量を行った後、液体窒素で急速冷凍し-80°C で保存した。

2-2-3 LtSQR の小スケール精製

すべての操作は 4°C で行った。2-2-2 で得られたミトコンドリア画分 90~100 mg を氷上で解凍後、可溶化緩衝液[10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0, 1

mM EDTA, 1 mM マロン酸ナトリウム, Protease inhibitor cocktail for general use、20 % (v/v)グリセロール]へと溶解し、同体積の 4 % (w/v) Sucrose monolaurate (SML)と穏やかに混和した[終濃度 2 % (w/v) SML]。この時、タンパク質終濃度は 20 mg/mL とした。混和標品は 4°C で 30 分間攪拌後、198,000 ×g、15 分間の遠心を行い、上清を可溶化 LtSQR 標品として得た。その後、この上清に終濃度 4 % (w/v)のポリエチレングリコール(PEG)3350 と 100 mM NaCl を混合し、氷上で 30 分間静置、さらに 9,000 ×g、5 分間の遠心を行った。得られた上清に再度 PEG3350 を加えて終濃度を 8 % (w/v)とした後、標品を氷上で 30 分間静置し、20,000 ×g、5 分間の遠心を行った。沈殿物は 2 mL の平衡化緩衝液[10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0、1 mM EDTA、1 mM マロン酸ナトリウム、1 % (w/v)スクロース、Protease inhibitor cocktail for general use] + 0.1 % (w/v) SML に懸濁し、10 mL の平衡化緩衝液で平衡化された内径 1 cm × 高さ 1.5 cm (1 mL)の EDM Fractogel DEAE M (Merck)へ 0.5 mL/min の流速で吸着させた。そして、同じ緩衝液で 10 mL の洗浄(0.5 mL/min)を行った後、50 mL の平衡化緩衝液+ 0.1 % (w/v) DDMにより LtSQR を溶出させた(0.5 mL/min)。さらに 10 倍体積の 0-250 mM NaCl 濃度勾配で残りの吸着タンパク質を洗浄した(流速 0.5 mL/min)。溶出標品は 1 フラクションあたり 1 mL ずつ分取し、280 nm (タンパク質)、412 nm (ヘム *b*)、450 nm (フラビン)の吸光度と SQR 活性とをそれぞれ測定した。SQR 活性を有するフラクションはピークごとに集め、Amicon Ultra15-100 kDa で濃縮脱塩後-80°C で保存した。

2-2-4 *T. cruzi* epimastigote ミトコンドリアの調製

当研究室の稲岡ダニエル健博士が調製した標品を用いた(49)。

2-2-5 LtSQR サブユニット解析

2-2-5-1 可溶化標品の hrCNE(73)

全ての操作は 4°C で行った。泳動標品を hrCNE 泳動緩衝液[50 % (v/v)グリセロール、0.1 % (w/v)ポンソーS]と 8 : 1 の割合で混合し、4-16 % Novex Native gel (Invitrogen) へと 1 ウェルあたり 10~20 µl 加えた。そして hrCNE 陽極緩衝液(25 mM イミダゾール-HCl 緩衝液 pH 7.0)と陰極緩衝液[7.5 mM イミダゾール、50 mM トリシン、0.02 % (w/v) ドデシルマルトシド

(n-dodecyl-D-maltoside: DDM)、0.05 % (w/v) デオキシコール酸ナトリウム] 中で約 2 時間 250V 定電流の泳動を行った。泳動後のゲルは SDH 活性染色法(74) およびクマシーブリリアントブルー(CBB)染色を用いて染色した。

SDH 活性染色では、泳動後のゲルを 5 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.4、25 mg/mL ニトロブルー・テトラゾリウム、120 $\mu\text{g/mL}$ PMS 中で振盪し、終濃度 1 mM コハク酸ナトリウムを加えて SDH を特異的に染色した。CBB 染色ではクマシーブリリアントブルーR-250 を用いた。

2-2-5-2 二次元 hrCNE/トリシン SDS-PAGE

約 200 μg (タンパク質量換算)の精製 LtSQR を hrCNE 泳動緩衝液と 8 : 1 で混合し、2-2-4-1 と同様の手法で hrCNE を行った。SDH 活性染色後、520 kDa 付近のバンドを切り出して SDS 泳動緩衝液[1 % (w/v) SDS、2 % (w/v) 2-メルカプトエタノール、10 % (w/v)グリセロール、0.02 mg/mL ブロモフェノールブルー]で変性処理を行った。

トリシン SDS-PAGE は Schagger の方法に従った(75)。トリシン PAGE 陽極緩衝液(100 mM Tris-HCl 緩衝液 pH8.9)とトリシン PAGE 陰極緩衝液(100 mM Tris 緩衝液 pH 8.5、100 mM トリシン)中に 12.5 % トリシングル (Invitrogen) を浸し、変性処理後のネイティブゲル切片をウェルに入れ 100 V 定電圧 100 分間の電気泳動を行った。泳動後のゲルは CBB 染色法により染色した。染色後のバンドは切り出して nano LC-MS/MS システム(wako)へ解析を依頼した。

2-2-6 酵素活性測定

すべての酵素活性測定は分光光度計 V 660(JASCO)を用いて 25°C で行った。

2-2-6-1 SDH 活性測定

コハク酸脱水素酵素(SDH)活性は、コハク酸存在下における 1 分間あたりの還元型 MTT の増加量で定義した。測定試料を 100 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 中で 120 $\mu\text{g/mL}$ PMS、120 $\mu\text{g/mL}$ MTT、1 mM KCN と混合し、200 秒間 25°C で保温した。その後、終濃度 10 mM コハク酸カリウムを加え、その時点からの還元型 MTT 吸光度の増加を観察した(Abs/min、 $\epsilon_{570}=17 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)。

2-2-6-2 SQR 活性測定

コハク酸-キノン酸化還元酵素(SQR)活性は、コハク酸および酸化型デシルユビキノン存在下における酸化型 2,4 dichlorophenolindophenol (DCIP)の 1 分間あたりの減少量で定義した。測定試料を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.5 中で 1 mM MgCl₂、60 μM DCIP、60 μM デシルユビキノンと混合し、5 分間保温した。その後、終濃度 10 mM コハク酸カリウムを加え、その時点からの酸化型 DCIP 吸光度の減少を観察した(Abs/min, ε₆₀₀=21 mM⁻¹ cm⁻¹)。

2-2-7 タンパク質定量

タンパク質定量法はウシ血清アルブミンを標準試料とし、microBCA kit (Thermo)を用いて行った。

2-3 結果

2-3-1 *L. tarentolae* ミトコンドリア画分調製

LtSQR 大量調製の前段階として、ミトコンドリア画分の大量調製を行った(表 2-2)。大量培養にあたっては、通常の *L. tarentolae* 培養で推奨される Brain heart infusion 培地ではなく、より高い細胞密度が報告されている Yeast extract 培地を用いた(68)。10L のファーメンター培養で最終細胞密度~5.8×10⁸/mL まで原虫を培養した後、1,000×g で遠心を行なって沈殿を得た。1,000×g 沈殿画分の SQR 全活性は 340μmol/min で比活性が 0.113 μmol/min/mg であった。ここで得られた SQR 全活性は *T. cruzi* の 10 L 培養から得られる SQR 全活性(27 μmol/min)の約 13 倍であった(表 2-2)。

2-3-2 LtSQR 精製

2-3-1 で調製したミトコンドリア画分を用いて、LtSQR の精製を行った(図 2-1)。TcSQR の場合と同様、タンパク質の可溶化は中性界面活性剤 SML を用いて行い、ミトコンドリア画分時の酵素活性を 100 %保持したまま LtSQR を水溶液中に可溶化できた。この可溶化画分を終濃度 4 % (w/v) PEG3350 で処理して LtSQR 以外のタンパク質の一部を沈殿として除き、続いて上清の PEG3350 濃度を 8 %まで上げることで LtSQR を選択的に沈殿させた。この操作により、ミトコンドリア時の 57 %の活性を保持したまま比活性を 7 倍に高めることが出来

た。続いて PEG 沈殿後の標品を 0.1 % (w/v) SML を含む平衡化緩衝液に溶解し、平衡化したカラムへのアプライ及び未吸着タンパク質洗浄(20 mL)を行った後、カラム緩衝液の界面活性剤組成を 0.1 %SML から 0.1 %ドデシルマルトシド(DDM)へと交換した(図 2-1A)。50 mL の緩衝液でカラムを洗浄すると、SQR 活性ピークの溶出が確認された(フラクション番号 39-46)。ピーク画分を用いて hrCNE および SDH 活性染色を行うと、活性溶出画分では SDH 活性染色のバンドが確認された(図 2-2)。ピークとして回収された全活性はミトコンドリア時の 7.1 %で *T. cruzi* 精製時の活性収率 1.6 %を上回っていた他、比活性は精製 TcSQR とほぼ同程度であった(精製 LtSQR: 2.78 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、精製 TcSQR: 2.9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (図 2-1B) (49)。ここで得られた標品中の LtSQR 純度は、hrCNE の染色強度から 50 %以上と予想される(図 2-3)。

2-3-3 hrCNE および質量分析による LtSQR サブユニット解析

2-3-1 及び 2-3-2 で調製した標品を用いて LtSQR のサブユニット解析を行った。まず 4-16 %の hrCNE を行い、SDH 活性染色を行なった。この際、当教室の稲岡ダニエル健博士が調製した *T. cruzi* ミトコンドリアを文献に従って可溶化し(49)、可溶化 LtSQR と同じゲル上で泳動した。その結果、LtSQR および TcSQR 双方の泳動レーンで 520 kDa 分子量相当の位置にバンドが観察された(図 2-3)。

さらに詳細なサブユニット解析を行うため、2-3-2 で部分精製した LtSQR を 4-16 % hrCNE によって泳動して活性染色し、染色部分のバンドを切り抜いて 2 次元目のトリシン SDS PAGE を行った(図 2-4)。その結果ゲル上に 66 kDa、59 kDa、37 kDa、27 kDa、23 kDa、19 kDa、15 kDa、14 kDa、13 kDa、12 kDa、10 kDa、9 kDa の合計 12 のバンドが判別され、それぞれが CBB 染色で化学量論的な強度に染色された。さらにこれらのバンドを切り出してそれぞれを LC-MS/MS 質量分析によって解析すると、SDH1-8 までの 9 種類のサブユニットが同定できた。これらの内、SDH3 の由来のペプチドは 15 kDa、14 kDa、13 kDa、12 kDa の 4 バンドから検出された。

2-4 考察

本章で確立した *L. tarentolae* のミトコンドリア調製法、および LtSQR の精製法により、理論上ミリグラム単位での 12 サブユニット SQR の大量精製が可能となった。本実験で見出した方法を繰り返して 10 L 培養から得られるミトコンドリア全てから LtSQR を精製した場合、得られる予想収量は 50 % 純度 LtSQR 標品が 2.89 mg であり、TcSQR 精製時(10 L 培地から 0.15 mg 精製酵素)の約 19 倍の効率となる。この SQR 収量は、これまで困難であった 12 サブユニット SQR の結晶化条件検討を始める上で十分な量である。

また、ここで確立した方法を用いて LtSQR を部分精製し、そのサブユニット構成をネイティブ電気泳動と LC-MS/MS 分析によって解析すると、TcSQR と同様 12 のバンドがゲル上に染色され、そこから 9 種の SQR サブユニット配列が見つかった。今回同定できなかったサブユニットは SDH9、SDH10、SDH11 であるが、これらのサブユニットは高い疎水性を示すことが予想されており(49)、質量分析では検出できなかったものと考えられる。この際、SDH3 が複数のバンドから検出されているが、これはリン酸化等によってペプチドが化学修飾されて移動度の異なる分子種が形成された可能性が考えられる。とりわけリーシュマニア属原虫においては、生活環のステージ間で呼吸鎖を始めとする代謝系酵素の発現量(76)とリン酸化状態(77)が変化することが知られている。興味深いことに、SDH4 は 4 サブユニット SQR の活性に直接関係するキノン結合部位を形成する疎水性サブユニットの一つであるが(78)、原虫 SQR サブユニットの化学修飾については詳細な知見が未だ無く、この結果の解釈には今後の研究が待たれる。ゲノム解析の結果から(表 2-1)、LtSQR 各サブユニット配列は *T. cruzi* (42-90 %)(51)と *T. brucei* (45-90 %)(50)に対して同一性が高く、病原性リーシュマニアに対しては極めてよく保存されていることが示唆される (81-98 %)(52)。これらの配列において、TcSQR で見出された SDH1 のコハク酸結合部位および FAD 結合部位、SDH2 の鉄硫黄クラスター結合部位、SDH3 と SDH4 に存在する“RPX₁₁SX₂HR”キノン結合モチーフ、SDH4 のキノン結合部位(49)は、全て LtSQR のオルソログにおいても保存されていた。これは、LtSQR がサブユニット構成及び基質結合部位の構造において、TcSQR を始めとする病原性トリパノソーマ SQR と共通性がある事を示している。以上の結果を踏まえ、次章では *L. tarentolae* と病原性トリパノソーマ科原虫の実際の阻害剤感受性を酵素活性測

定法により比較し、抗トリパノソーマ科原虫論理的創薬の阻害剤探索において **LtSQR** がモデルとして有用であることを検証した。

第3章 薬剤開発に向けたトリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II 選択阻害剤の探索

3-1 目的

2章において、非病原性 *L. tarentolae* が複合体 II の大量調製に適し、LtSQR の性質がサブユニット構成および基質触媒部位周辺構造の点で病原性トリパノソーマ科原虫 SQR に類似していることが示された。そこで本章では、マイクロプレートリーダーを用いた LtSQR の阻害剤スクリーニング系を開発すると共に、病原性トリパノソーマ科原虫との間で酵素の阻害剤感受性を比較し、LtSQR がトリパノソーマ科原虫全体の SQR 阻害剤探索に用いることが出来るかを評価した。さらにここで確立したスクリーニング系を用いて、代表的なトリパノソーマ科原虫症治療薬や呼吸鎖阻害剤に対する小規模なスクリーニングを試験的に行った。スクリーニングを行う阻害剤の選定にあたっては、当研究グループで行われた *T. brucei* alternative oxidase (TAO)(29, 79)やブタ回虫 *A. suum* 呼吸鎖複合体 II に対する SBDD、そして緑膿菌 *P. aeruginosa* 呼吸鎖複合体 II へのスクリーニング(80)時に構築したキノン結合阻害剤ライブラリーを利用した。この結果、抗真菌薬シッカニンで高い LtSQR 選択阻害および病原性トリパノソーマ科原虫 SQR 選択阻害が認められたため、この化合物に関して酵素学的な阻害様式の決定を行うとともに、トリパノソーマ科原虫の増殖自体に対する影響を *in vitro* で測定した。

3-2 方法

3-2-1 *L. donovani* ミトコンドリアの調製

本項は東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫学研究室の長田康孝博士との共同研究として行った。*L. donovani* D10 株 promastigote を 10 %FBS、100 U/ml ペニシリン及び 100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した培地で 25 °C で培養した。培養系は 1 L までスケールアップ後、後期対数増殖期で細胞を回収した。細胞破碎およびミトコンドリア調製は 2-2-1 と同様に行い、ミトコンドリア画分は液体窒素で凍結後使用まで -80 °C で保存した。

3-2-2 *T. b. brucei* ミトコンドリアの調製

東京大学医学系研究科生物医化学教室の河合氏により調製された標品を用い

た。*T. b.-brucei* GUTat 3.1 株 procyclic 型は文献に従い培養した (30)。回収した細胞は氷上で扱い、以下の操作でミトコンドリア画分の調製を行った。細胞沈殿を 4 mL 細胞懸濁液[50 mM HEPES (pH 7.2) 、0.27 M スクロース、1 mM EDTA, 1 mM 塩化マグネシウム、1 mM PMSF]に懸濁してガラスビーズ(半径 0.10 - 0.11 mm, B. Braun Biotech International, ドイツ) と混合して 2 分間激しく攪拌した。900 × g、5 分間の遠心でガラスビーズと未破碎細胞と遠心で除去後、12,000 × g 、10 分間の遠心でミトコンドリア画分を得た。ミトコンドリアは必要最少量の細胞懸濁液 D (10 mM リン酸化カリウム緩衝液 (pH 7.5)、0.25 M スクロース、1 mM EDTA)に懸濁し、液体窒素で凍結後使用まで-80 °C で保存した。

3-2-3 ブタミトコンドリアの調製

ブタ心筋ミトコンドリア(61)は京都工芸繊維大学工芸科学研究科構造生物工学教室の原田繁春博士より供与された。

3-2-4 トリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II 阻害剤探索

東京大学生物医化学教室のキノン結合部位阻害剤ライブラリーを用いて、トリパノソーマ科原虫 SQR に対する阻害活性スクリーニングを行った。活性測定は 96 ウェルマイクロプレートで行い、各化合物の阻害活性は SQR 活性 50 %阻害濃度 (IC₅₀)で評価した(n=3)。標準的な SQR 阻害剤に対する感受性を LtSQR と病原性トリパノソーマ科原虫 SQR とで比較するため、*T. cruzi* epimastigote ミトコンドリア 、*T. b. brucei* procyclic ミトコンドリア、*L. tarentolae* promastigote ミトコンドリア、*L. donovani* promastigote ミトコンドリア、そしてブタ心筋ミトコンドリアを用いた阻害活性測定を行った。マイクロプレート上で 1 ウェル当たり終濃度約 800 µg/mL のミトコンドリアを 193 µL の反応液[50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)、60 µM DCIP、60 µM ubiquinone-1 (UQ₁)]に懸濁した。5 種の一般的な SQR 阻害剤[マロン酸、カルボキシシン、Thenoyltrifluoroacetone (TTFA) (Sigma Aldrich)、アトペニン A5 (Enzo Life Science)]の希釈系列を 8 段階作成し、各希釈条件についてそれぞれのウェルに 2µl 加えて反応液と混合した。Mixmate (Eppendorf)を用いて 60 秒間 750rpm の攪拌後、10 mM のコハク酸ナトリウムを添加することで SQR 反応を開始し

た。反応はマイクロプレートリーダーSpectraMax (system device)を用いて 600 nm 波長吸収をモニターし、10 分間の DCIP 減少量で活性を評価した。LtSQR を用いた阻害剤スクリーニングにおいては、11 種のキノン系阻害剤[(アンチマイシン A (Sigma Aldrich), アスコフラノン, アトバコン (USP), フェルレノール(Enzo Life Science), フルオピラム (Sigma Aldrich Japan)、Ku-55933 (Abcam)、ニタゾキサミド (Wako)、ニフロチモックス(Wako)、フルトラニル(日本農薬)、ロテノン(Wako)、シッカニン(第一三共)]を *L. tarentolae* ミトコンドリアが含まれる反応液に混合し、マイクロプレート上で上記と同様に SQR 活性を測定した。これらの化合物について阻害率(%)= [阻害剤存在時 SQR 活性 / 1 %DMSO 存在時 SQR 活性]を算出し、阻害剤濃度を横軸にプロットして各化合物の阻害曲線から IC₅₀ を計算した。

続いて阻害剤スクリーニングにおいて高い選択性を示した化合物シッカニンの阻害機構を推定した。*L. tarentolae* ミトコンドリアを 100 µL の反応液[50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)、60 µM DCIP、0.5 % (v/v) ジメシチルスルホキシド (DMSO)]にマイクロプレート上で加え、終濃度 0、0.25、0.5 または 1 µM のシッカニンを混合した。続いて UQ₁ を 100 µL の反応液に加えて終濃度 0.05-100 µM の 8 段階希釈系列を作成し、マイクロプレート上で先に調製した 100 µL のミトコンドリア含有反応液と混合した。活性測定は阻害剤スクリーニング時と同様に行った。混合阻害時の酵素学的パラメーターはミカエリス・メンテン式より導出した(81)。

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_{i1}} \right) + 1 + \frac{[I]}{K_{i2}}}$$

この時 v: SQR 反応速度(nmol/min/mg)、[I]:シッカニン濃度(nM)、[S]:キノン濃度(nM)、V_{max}:最大反応速度(nmol/min/mg)、K_m:ミカエリス定数(n M)、K_{i_n}:阻害定数(nM)とし、シッカニンと酵素との結合は可逆的と仮定した。

3-2-5 *In vitro* におけるシッカニンの抗トリパノソーマ科原虫作用

3-2-5-1 *L. tarentolae* promastigote

L. tarentolae promastigote に対するシッカニンの増殖阻害効果をアラマブルーアッセイ(82)によって測定した。*L. tarentolae* は 2-2-1 と同様に YE 培地で継代した。シッカニンは YE 培地 50µL に希釈し、終濃度 0.05-50 µM の 8 段階希釈系列

を作成した。 2×10^6 promastigotes を含む 50 μ L の YE 培地を 96 ウェルマイクロプレート上で当量のシッカニン希釈系列と混合し、26 $^{\circ}$ C で 72 時間培養した。原虫の生存率を算出するため、5 μ L アラマブルー(82) をそれぞれのウェルに加えて 3 時間培養し、570 nm と 600 nm との波長吸収差をマイクロプレートリーダー SpectraMax (Molecular Devices) で測定した。DMSO を陰性コントロール、50 μ M ペンタミジン(Sigma Aldrich) を陽性コントロールとした。増殖阻害率(%) = $[100 - (\text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{600}) / (\text{Abs}_{570\text{DMSOcontrol}} - \text{Abs}_{600\text{DMSOcontrol}}) \times 100]$ として算出した。

3-2-5-2 病原性リーシュマニア

本項は東京大学大学院農学生命科学研究科応用免疫学研究室の松本芳嗣博士、後藤康之博士との共同研究として行った。3-2-5-1 と同様に、病原性リーシュマニア *L. donovani* および *L. major* に対するシッカニンの増殖阻害効果をアラマブルーアッセイ(82)によって測定した。*L. major*、*L. donovani* は 3-2-5-1 同様 199 培地 (Life Technologies) で培養した。シッカニンの増殖阻害評価は 1 ウェル当たり 2×10^5 cells で行い、シッカニンの終濃度は 0.05-100 μ M とした。陰性コントロールは DMSO、陽性コントロールは amphotericin B (Sigma Aldrich, 終濃度 0.000139-11 μ M) とした。72 時間の培養後、10 μ l Alamar Blue (Life Technologies) を各ウェルに加え、それぞれの蛍光強度(FI)を SpectraMax Paradigm microplate reader (Molecular Devices) で測定した。この際、励起波長を 555 nm、発色波長を 595 nm とし、アラマブルー添加直後(0 h)と 4 時間後(4 h)の 2 点で測定を行った。増殖阻害率 (%) = $[100 - (\text{FI}_{\text{test at 4h}} - \text{FI}_{\text{test at 0h}}) / (\text{FI}_{\text{control at 4h}} - \text{FI}_{\text{control at 0h}}) \times 100]$ とし、 IC_{50} は GraphPad Prism5 (GraphPad Software) を用いて算出した。

3-2-5-3 *T. b. brucei*

本項は東京大学医学系研究科生物医化学教室の柘植千明氏との共同研究として行った。*T. b. brucei* 血流型のシッカニン増殖阻害効果をアラマブルーアッセイで測定した。原虫の培養は HMI-9 培地中で 37 $^{\circ}$ C、5 % CO_2 の条件で行った。原虫は 1 ウェル当たり 5×10^4 とし、シッカニン希釈系列は 0.05~90 μ M とした。シッカニン添加 18 時間後、10 μ L のアラマブルー(TREK Diagnostic Systems)を各ウェルに加えて 6 時間培養した。増殖阻害率の算出は *L. tarentolae* 同様 3-2-5-1 に従って行った。

3-2-5-4 *T. cruzi*

本項は順天堂大学医学部熱帯医学寄生虫学講座の奈良武司博士に実験を依頼した。*T. cruzi* Tulahuen 株 trypomastigote の *in vitro* におけるマウス 3T3-SWISS Albino 線維芽細胞(JCRB9019, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation) への感染性評価を文献に従って行った(83)。

3-2-6 酵素活性測定

L. tarentolae ミトコンドリアの NADH-ユビキノン酸化還元酵素 (NDH2)—複合体 III 複合活性、複合体 II (SQR)—複合体 III 複合活性、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (G3PDH)—複合体 III 複合活性を酸化型シトクロム *c* の還元速度 (Abs/min, $\epsilon_{550} = 19.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)測定した。50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)、50 mM 酸化型シトクロム *c*, 1 mM KCN に終濃度 100 $\mu\text{g/mL}$ *L. tarentolae* ミトコンドリアを添加して 25 °C、300 秒間保温し、基質[NDH2 : 100 μM NADH、SQR : 10 mM コハク酸、G3PDH:20 mM グリセロール-3-リン酸 (G3P)]を添加して酵素反応を開始した。吸光度測定は測定は V-650 double monochromatic spectrophotometer (JASCO)を用いて行った。

3-3 結果

3-3-1 LtSQR を用いたトリパノソーマ科原虫 SQR 阻害剤アッセイ系の確立

2 章で調製法を確立した LtSQR をモデルとして 12 サブユニット SQR の阻害剤スクリーニングを行うため、その前段階として LtSQR と病原性トリパノソーマ科原虫との間で阻害剤感受性の比較を行った(表 3-1)。ここで新たに調製したミトコンドリアは内臓リーシュマニア症の病原体 *L. donovani*、ナガナ病の病原体である *T. b. brucei*、そして大型哺乳類であるブタの心筋由来の標品で、*L. tarentolae* と *T. cruzi* のミトコンドリアは2章の標品を引き続き使用している。これらのミトコンドリアに対する4種の一般的な SQR 阻害剤(マロン酸、アトペニン A5、カルボキシシン、TTFA)の IC₅₀ を比較すると、LtSQR は他の病原性トリパノソーマ科原虫 SQR と同様、キノン系阻害剤に対する感受性が哺乳類に比べて低い傾向にあった。例えば、アトペニン A5 はブタ心筋 SQR を強力に阻害する

(IC₅₀: 0.005 μM)のに対し、LtSQR への阻害効果はその 1400 分の 1 (IC₅₀: 7.1 μM) で、*T. cruzi* (IC₅₀: 13.1 μM)、*T. b. brucei* (IC₅₀: 10.9 μM) 、*L. donovani* (IC₅₀: 6.5 μM) と近い値であった。またブタ SQR を阻害したカルボキシシン、TTFA についても、LtSQR は他のトリパノソーマ科原虫 SQR と同様、100 μM の高濃度でも全く阻害されなかった。一方で、コハク酸結合部位に対する阻害剤であるマロン酸に対する IC₅₀ は、このアッセイ系では哺乳類と原虫の間に大きく異ならなかった。以上の結果は、LtSQR のキノン結合部位周辺の構造は哺乳類と大きく異なる一方、病原性トリパノソーマ科原虫の SQR とは共通部分がある事を示している。

すでに 2 章のサブユニット解析の結果から、LtSQR のサブユニット構造がタンパク質レベルでも TcSQR と類似していると予想されていたが、本項の結果は酵素の阻害剤感受性レベルにおいても LtSQR が病原性トリパノソーマ科原虫の良いモデルとなり得ることを示している。

3-3-2 トリパノソーマ科原虫 SQR に対する選択的阻害剤の探索

3-3-1 の結果は、LtSQR が他の 12 サブユニット SQR と阻害剤感受性の傾向を共有している事を示すとともに、一般的な SQR 阻害剤が原虫 SQR の阻害剤として機能しない事を示している。これを踏まえて、本研究では LtSQR をモデルとして新たな原虫 SQR 阻害剤の探索を行った。将来の薬剤開発を念頭においた場合、ここで探索する化合物は LtSQR を強力に阻害するのみならず、宿主である哺乳類の SQR には阻害効果を示さないのが望ましい。3-3-1 で示されたように、哺乳類 SQR と原虫 SQR との IC₅₀ はキノン結合部位阻害剤(アトペニン A5, カルボキシシン, TTFA) で高く、コハク酸結合部位阻害剤(マロン酸)で低い傾向にあった(表 3-1)。またその阻害剤低感受性にもかかわらず、トリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II においてもキノン結合部位を形成する CybL および CybS サブユニットオルソログ(SDH3、SDH4)が存在する。そこで既知のキノン結合阻害剤から原虫特異的な複合体 II 阻害剤が見出される可能性も考慮し、当研究室で構築したブタ回虫 *A. suum* 呼吸鎖複合体 II 阻害剤をはじめとするキノン結合阻害剤ライブラリーから 10 種の代表的な阻害剤を選び、LtSQR 活性阻害を測定した(表 3-2)。ここでアッセイを行った化合物は、複合体 I の代表的阻害剤であるロテノン、哺乳類呼吸鎖 II 阻害剤であるフェルレノール(84)、真菌複合体 II 阻害剤である一方で大型哺乳類 SQR は阻害しない抗菌剤シッカニン(80, 85)およびフルオ

ピラム(44)、複合体 II に阻害効果を示す抗癌剤 KU-55933(86)、呼吸鎖複合体 I-II 活性を阻害する駆虫薬として知られ(87)、かつ内臓リーシュマニア症病原体 *Leishmania infantum* にミトコンドリア膜電位低下を伴う細胞死を引き起こす(88) ニタゾキサニド、回虫呼吸鎖複合体 II 選択的阻害剤フルトラニル(1 章)、代表的呼吸鎖複合体 III 阻害剤アンチマイシン A、マラリア原虫呼吸鎖複合体 III の阻害剤アトバコン(89, 90)、そして *T. brucei* の薬剤標的であるキノール酸化酵素 TAO 阻害剤アスコフラノン(1 章)である。上記の化合物に加え、既存のトリパノソーマ科原虫症治療薬で広く用いられているニフロチモックス(3, 26)についても複合体 II に阻害効果を確認した。これら合計 11 種の阻害剤は、フェルレノールと抗菌剤シッカニン(91) (図 3-1)の 2 つを除いて LtSQR に対して阻害効果を示さなかった($IC_{50} > 50 \mu M$)。フェルレノールは LtSQR に対して比較的高い阻害効果を示したものの ($IC_{50} = 5.3 \mu M$)、この化合物は哺乳類 SQR に対する阻害剤としても知られており、哺乳類への細胞毒性も示すため(84, 92)、薬剤開発への応用は難しい。一方で、シッカニンは LtSQR に対して nM オーダーの IC_{50} (190 nM、図 3-1、表 3-3)を示した化合物であり、既存の SQR 阻害剤と比較して新規な骨格を備え(93)、哺乳類 SQR に対してほとんど阻害効果を示さない事が知られている($IC_{50} = 861 \mu M$) (80)。以上の結果はシッカニンがトリパノソーマ科原虫の薬剤として利用する上で有利な条件を備えていることを示している。

3-3-3 シッカニンの LtSQR 阻害機構の生化学的解析

より詳細にシッカニンの LtSQR 阻害機構を調べるため、LtSQR を用いた酵素学的解析を行った。すなわち 100、250、500 nM の 3 段階濃度のシッカニン存在下におけるキノン濃度変化に対する LtSQR 活性をラインウェーバー・バークプロットによって解析し、キノン結合部位に対するシッカニンの結合様式を推定した(81)(図 3-2)。ここで得られた結果から、シッカニンがキノン結合部位に対して混合阻害として作用する事が示された ($K_{mQ1} = 4631 \text{ nM}$ 、 $V_{max} = 47.13 \text{ nmol/min/mg}$)。また酵素単体に対する阻害剤親和性($K_{i1} = 39 \text{ nM}$)が酵素—キノン複合体への阻害剤親和性より高い($K_{i2} = 102 \text{ nM}$)ことから、シッカニンの結合がキノン存在下においては若干低下するものの、キノンの酵素への結合によってはシッカニンの阻害効果が完全には妨げられない事が示される。これらの結果は、シッカニンがキノン結合部位そのものではなくその近傍に結合していることを

示す。一方で、コハク酸から人工基質 PMS および MTT への電子伝達を測定する SDH 活性(94)を 50 μM シッカニン存在下で本項において測定すると、阻害率は 0 %であった。SDH 活性においてコハク酸から奪われた電子は Ip サブユニットを介して親水性の PMS へと伝達され、その反応にキノン結合部位を必要としない(図 3-3)。この反応が高濃度のシッカニン存在下で進行するという結果は、シッカニンの結合が酵素のコハク酸から PMS への電子受容を妨げない事を示している。また、シッカニンが 2 つのシクロヘキサン環、1 つのオキサン環、1 つのベンゼン環から成る cis, syn, cis-融合式脂環状構造の疎水性分子であることを考慮すると(図 3-1)(93)、この化合物が親水性基質であるコハク酸の結合部位に親和性を示す可能性は低い。続いて、シッカニンの *L. tarentolae* ミトコンドリア呼吸鎖における他のキノン結合タンパク質に対する阻害効果を測定した(図 3-4)。すると、シッカニンは呼吸鎖複合体 I、複合体 III、G3PDH の活性を 50 μM でも阻害しなかった。これらの結果から、シッカニンは呼吸鎖複合体 II のキノン結合部位周辺に対してのみ結合する事が明らかになった。

3-3-4 病原性トリパノソーマ科原虫に対するシッカニンの効果

シッカニンはこれまで報告された中で最大かつ唯一の LtSQR 選択阻害効果を持った化合物である。そこで、シッカニンの抗トリパノソーマ症治療薬への応用可能性を探るべく、まず病原性トリパノソーマ科原虫 SQR (*T. cruzi*, *T. b. brucei*, *L. donovani*)に対するシッカニンの阻害効果を測定した(図 3-5、表 3-3)。3-3-1 における阻害剤感受性比較から予想される通り、これらの原虫 SQR に対する IC₅₀ はそれぞれ 1.48 μM 、0.368 μM 、1.17 μM と低く、LtSQR のみならずトリパノソーマ科原虫全体の SQR が強力に阻害された。

これを踏まえ、シッカニンのトリパノソーマ科原虫細胞に対する増殖阻害効果を *in vitro* で測定した。取り扱いの容易さから、ここではまず *L. tarentolae* promastigote をモデルに抗リーシュマニア原虫効果のアッセイを行った。アラマブルーアッセイによって調べた IC₅₀ は 4.4 μM で(図 3-5、表 3-3)、抗リーシュマニア症薬剤であるペンタミジンとほぼ同じ値であった(6.3 μM)。これを踏まえて、内臓性リーシュマニア症の病原体である *L. donovani* と皮膚粘膜性リーシュマニア症病原体の *L. major* へのシッカニン IC₅₀ を測定した(東京大学松本芳嗣博士、後藤康之博士、長田康孝博士との共同研究)。*L. tarentolae* と同様、*L. donovani*

と *L. major* promastigote の増殖はそれぞれ 0.7 μM と 13 μM の IC_{50} でシッカニンにより阻害された(図 3-5、表 3-3)。また、シッカニンは *T. brucei* と *T. cruzi* の SQR も選択阻害することから、これらの原虫に対する増殖阻害効果も調べた(表 3-3)。*T. brucei* に関しては研究用のモデル系として使用されているナガナ病の病原体である *T. b. brucei* を用いてアッセイを行った(東京大学柘植千明氏に依頼)。シッカニンは *T. b. brucei* 血流型を 8.3 μM の IC_{50} で増殖阻害した他、*T. cruzi* trypomastigote を感染させたマウス線維芽細胞内における *T. cruzi* amastigote 細胞数が 10 μM シッカニン存在下で DMSO 添加時の 50.4 %に減少した(順天堂大学奈良武司博士に依頼)(表 3-3)。これらの結果はシッカニン主要な病原性トリパノソーマ科原虫全てに対して細胞レベルで増殖阻害効果を持っている事を示している。

3-4 考察

本章ではヒトに感染せず、調製の容易な LtSQR を用いたトリパノソーマ科原虫 SQR 阻害剤スクリーニング系を構築し、キノン結合部位阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。その結果、化合物シッカニンにおいて非常に高いトリパノソーマ科原虫 SQR 選択阻害効果が認められ、*L. tarentolae* ミトコンドリア SQR を用いて行ったラインウェーバー・バークプロット(81)ではシッカニンの阻害様式が基質であるユビキノンに対し混合阻害と明らかになった。一般的な阻害剤である競合阻害剤の場合は、基質と阻害剤は同時に酵素へ結合できず、阻害剤の効果は周辺環境の基質濃度に影響される。すなわち基質濃度が高い場合、阻害剤の結合部位は基質によって占められ、阻害効果を示さない。対して混合阻害剤の場合、化合物は酵素単体および酵素-基質(キノン)複合体の両方に結合する。3-3-3 で示されたとおり、シッカニンの酵素-キノン複合体に対する親和性($K_{i2} = 102 \text{ nM}$)は酵素単体に対する親和性($K_{i1} = 39 \text{ nM}$)に比べて弱い、いずれも nM オーダーと低い値である。第二阻害定数 K_{i2} は、全ての酵素に基質が結合した状態(3-2-4 反応速度式[S] $\rightarrow\infty$)で反応速度 v を最大反応速度 V_{max} の半分に低下させるために必要な阻害剤濃度に等しく、その値は基質濃度に依存しない。すなわち、シッカニンが実際に原虫内に取り込まれた際、102 nM のシッカニンが酵素周辺に存在すれば、虫体ミトコンドリア中のキノン濃度に依らず酵素活性を半減させられる事を示している。理論上、LtSQR-キノン複合

体の酵素活性 99 % 阻害は 10.1 μM のシッカニン存在下で達成されるが、ブタ心筋ミトコンドリア SQR に対するシッカニンの IC_{50} は 861 μM で、10 μM における活性阻害はみられない(80)。このことは、シッカニンを宿主体内のトリパノソーマ科原虫へ作用させた場合、宿主の呼吸鎖複合体 II に影響を与えずに原虫酵素のみを阻害できる可能性を示している。

またシッカニンは、*L. tarentolae* の増殖自体も既存の抗トリパノソーマ薬のペンタミジンと同等の IC_{50} で阻害することが見出された。さらに 3-3-4 で示されたように、シッカニンはシャーガス病の病原体 *T. cruzi*、ナガナ病の病原体である *T. b. brucei*、そして内臓リーシュマニア症と皮膚リーシュマニア症の病原体である *L. donovani* と *L. major* と、非常に幅広い種のトリパノソーマ科原虫の SQR と細胞増殖を阻害した。シッカニンは NDH2、呼吸鎖複合体 III、G3PDH といった *L. tarentolae* ミトコンドリアに存在する他のキノン依存的な酵素には阻害効果を示さないことから、少なくともミトコンドリアにおいてはシッカニンの標的分子が複合体 II であると考えられる。すなわち上記の結果は SQR がトリパノソーマ科原虫の生存と増殖に対して重要な役割を果たす可能性を示している。

呼吸鎖複合体 II が原虫で果たす役割は、一つは TCA 回路におけるコハク酸—フマル酸の変換が考えられる。*T. brucei* 昆虫型、*T. cruzi* 及びリーシュマニアにおいては、全ての TCA 回路酵素と呼吸鎖複合体 III-V が発現している。しかし *T. b. brucei* 昆虫型での研究から、原虫の TCA 回路ではクエン酸からイソクエン酸への変換が行われず、結果としてサイクルが途中で分断されていることが示唆されている(95)。トリパノソーマ科原虫の解糖系を通じて生じるアセチル CoA は、酢酸発酵経路に入りアセチル：サクシニル CoA トランスフェラーゼとサクシニル CoA 合成酵素から成るサイクルによる基質レベルの ATP 合成に用いられるか、TCA 回路でクエン酸へと変換されてミトコンドリア外に輸送され脂肪酸合成経路に入る(96)。*T. b. brucei* 昆虫型および *T. cruzi* において、分断されたイソクエン酸以降の TCA 回路は、解糖系とは独立なプロリン代謝による α -ケトグルタル酸の供給によって再開され、通常の TCA 回路同様にサクシニル CoA、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、オキサロ酢酸を経てイソクエン酸を産生する事が報告されている(97, 98)。この特殊な TCA 回路において、呼吸鎖複合体 II は哺乳類等と同様にコハク酸をフマル酸へ酸化する SQR 反応を行う。ここで産生されるフマル酸はマレイン酸へと変換後、一部はマレイン酸としてミトコン

ドリア外へ排出されて糖新生に、一部は TCA 回路でクエン酸まで変換されて脂肪酸代謝に用いられる事が示唆されている(99)。この TCA 回路は低グルコース状態における原虫の生存に重要な役割を果たすと考えられ、*T. b. brucei* 昆虫型の *in vitro* 培養ではグルコース枯渇時にプロリンを主要炭素源として培養した場合のみ呼吸鎖複合体 II のノックダウンが致死になることが知られている(100)。本研究において見出したシッカニンは、このノックダウンと同様の効果を TCA 回路に与えると予想されるが、さらなる詳細はシッカニンを取り込んだ状態での原虫のメタボローム解析が必要である。

シッカニンのもう一つの効果は、呼吸鎖複合体 II 阻害を介した酸化的リン酸による ATP 合成の低下が考えられる。これまでの所、原虫呼吸鎖複合体 II が酸化的リン酸化に寄与する割合は分かっていない。しかし 1-7 で触れたように、トリパノソーマ科原虫は不完全なグルコース代謝の結果として、最終代謝産物の一つとして呼吸鎖複合体 II の基質であるコハク酸を産生する。トリパノソーマ科原虫のピリミジン *de novo* 生合成経路の一部であるジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHODH)もジヒドロオロト酸の酸化をフマル酸の還元に共役しており、代謝産物としてコハク酸を産生する(101)。すなわち、トリパノソーマ科原虫の細胞内にはコハク酸が高濃度で存在していると考えられ、その一部が呼吸鎖複合体 II を介して原虫の ATP 合成に寄与している可能性がある。しかし実際にどの程度の割合のコハク酸がミトコンドリアで複合体 II の基質となって消費されているかについては明確な知見がなく、今後の研究が待たれる。また、シッカニンは機能的な酸化的リン酸化経路や TCA 回路を持たない *T. brucei* 血流内型の生存と増殖も阻害することから、この化合物が呼吸鎖複合体 II 以外の標的を持つ可能性がある。標的の候補としては、エルゴステロール生合成系が考えられる。トリパノソーマ科原虫は細胞膜の維持にエルゴステロールと呼ばれるコレステロール系物質の生合成が必要であり、この経路はトリパノソーマ科原虫における有望な薬剤標的となっている(102, 103)。このエルゴステロールの炭素骨格構造はシッカニンと類似していることから、シッカニンがこの生合成系に対する阻害剤として働く可能性も考えられる。

これまでの研究から、トリパノソーマ科原虫は媒介昆虫内と哺乳類宿主内で大きく異なる代謝系を有することが知られている。本研究において、リーシュマニア属原虫の増殖阻害はヒト細胞内型の *amastigote* ではなく媒介昆虫内の

promastigote で測定している。しかし amastigote は promastigote に比べてミトコンドリア呼吸鎖複合体の発現が亢進しており、ATP 産生における脂肪酸代謝と酸化リン酸化の寄与が大きくなると考えられることから(76)、promastigote 同様にシッカニンが増殖阻害効果を示す可能性が高い。さらに、本研究では *T. cruzi* の細胞内寄生型 amastigote、およびナガナ病の病原体 *T. b. brucei* の血流内型に対してシッカニンの効果が認められた。これらの結果は、シッカニンが複数のトリパノソーマ科原虫の増殖を哺乳類宿主体内で阻害できる可能性を示している。トリパノソーマ科原虫の主要な分布域である中南米やアフリカにおいては、複数種のトリパノソーマ症が同じ地域に流行している場合もあり(WHO)、シッカニンの幅広い作用スペクトルはこれら複数のトリパノソーマ症の制圧を考える上で有用な性質である。一方で、*T. brucei* は薬剤に対する感受性が亜種間で大きく異なることが知られており(1, 27)、実際にシッカニンがアフリカ睡眠病治療に効果を示すかは今後の検証が必要となる。

シッカニンは真菌 *Trichophyton mentagrophytes* の SQR 阻害剤として 1960 年代に見出され(91, 93)、水虫薬として実用化されていた化合物である。皮膚病の治療薬としてはすでに動物実験及び臨床試験が行われており(85)、完全に新規な化合物に比べて副作用等に関する安全性がある程度確認されている利点がある。しかし内服薬としての試験は行われておらず、薬剤としての利用には更なる動物実験による毒性試験が必要であると考えられる。またシッカニンを薬剤として用いる場合、宿主体内に存在する原虫に対して薬剤が効果を発揮する必要がある、ヒトの細胞膜と原虫の細胞膜を通過する必要がある。シッカニンは第一三共株式会社により抗水虫薬として実用化されていたが、血液中での挙動およびヒト細胞への取り込み機構については知見が報告または公開されていない。化学構造の類似性から、コレステロールと類似の挙動を示す可能性はあるが、この点についてはヒト細胞を用いた更なる解析が必要となる。トリパノソーマ科原虫への薬剤の取り込みも、現段階では分かっていない。1-6 で触れたとおり、トリパノソーマ科原虫は AT1 や PT を始めとする様々な薬剤トランスポーターを有しているが、シッカニンは既存の薬剤と比べて骨格が新規であり、これらを用いた能動輸送を行っているかは定かではない。その疎水性から、細胞膜を受動的に透過する可能性も考えられるが、具体的な機構については今後の研究が必要である。

第4章 シッカニンのブタ回虫呼吸鎖複合体 II に対する阻害効果

4-1 目的

現在、土壌伝播線虫症やリンパ系フィラリア症といった寄生性線虫症の分布域は中南米、アジア、アフリカとなっており、トリパノソーマ科原虫症の感染地域と大きく重複している(WHO、図 1-1、1-2)。3 章においてはトリパノソーマ科原虫複合体 II の阻害剤シッカニンがトリパノソーマ症治療薬として有望であることを示したが、1 章でも触れた通り、回虫をはじめとする寄生性線虫においても呼吸鎖複合体 II は重要な新規薬剤標的の一つである。当研究室では、生化学的解析の可能なブタ回虫 *Ascaris suum* をモデルに用いて、寄生性線虫の宿主環境適応における呼吸鎖複合体 II の機能を解明するとともに、X 線結晶構造解析による回虫呼吸鎖複合体 II に対する選択的阻害剤の探索を行ってきた。これまでの研究により、哺乳類宿主内に生育する *A. suum* 成虫は複合体 I および II 以外の好氣的な呼吸鎖の機能を失い、複合体 I、複合体 II、低電位のロドキノンから構成されるフマル酸呼吸系によって低酸素状態におけるエネルギー代謝を行うことが明らかになっている。これはホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)—コハク酸経路の最終ステップであり、解糖系によって生じた NADH からフマル酸へ電子伝達を行うことで複合体 I の NADH 依存のプロトンポンプを駆動し、酸素が存在しない状態における ATP 産生を可能にする。この経路は寄生性線虫における重要な薬剤標的であり、当教室では線虫複合体 I の阻害剤であるナフレジンが捻転胃虫に対して駆虫効果を示すことを報告している(104)。捻転胃虫は羊やヤギなどの大型哺乳類を宿主とする線虫で、畜産業に対して大きな経済的被害を与えている一方で薬剤耐性株が出現している寄生虫である(105)。

これまで当教室ではシッカニンの様々な生物の SQR に対する阻害効果を測定しており、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* の SQR を低い IC_{50} で阻害する性質が知られていた($IC_{50} = 0.87 \mu M$)(80)。この時 *P. aeruginosa* SQR に対するシッカニンの阻害様式はキノンに対して混合阻害、コハク酸に対して非競合阻害であり、LtSQR の場合と同様シッカニン結合部位はキノン結合部位周辺と推定された。さらに、シッカニンは 4 サブユニット SQR 阻害効果において複雑な種選択性を示すことが明らかになっており、*T. mentagrophytes* ($IC_{50} = 0.09 \mu M$)(85)およびラット($IC_{50} = 9 \mu M$)の SQR を比較的によく阻害する一方、大腸菌($IC_{50} = 210 \mu M$)およ

びブタ ($IC_{50} = 860 \mu M$) の SQR に対しては阻害効果をほぼ示さない。シッカニンが感染性線虫の呼吸鎖複合体 II に対して阻害効果を示した報告はないが、同じ線虫類のモデル生物 *Caenorhabditis elegans* の発達をシッカニンが阻害する知見が得られている(106)。そこで本章では、当教室で精製した *A. suum* 呼吸鎖複合体 II を用いてシッカニンの阻害活性を測定するとともに、*in vitro* において *A. suum* の生存に対してシッカニンの与える影響を評価した。

4-2 方法

4-2-1 *A. suum* 呼吸鎖複合体 II の精製

生化学的解析および結晶化に用いた成虫 *A. suum* 複合体 II の精製標品は東京大学医学系研究科稲岡ダニエル健博士の調製による(58)。精製酵素は PEG3350 沈殿によって濃縮し、使用まで $-80^{\circ}C$ で保存した。

4-2-2 酵素活性測定

複合体 II 酵素活性測定、阻害様式決定は 2 章 3 章と同様に行った。しかし SQR 活性の測定におけるキノン基質は Decyl-ubiquinone (Sigma Aldrich)を使用した。

4-2-3 *A. suum* 成虫に対するシッカニンの効果

屠殺場から入手した成虫雄 *A. suum* を $100 U/mL$ ペニシリン/ストレプトマイシンを加えた PBS 中で 24 時間 $30^{\circ}C$ で培養した。続いて虫体を 1 匹ずつ内径 8-mm のガラス管に入れ、 $100 \mu M$ シッカニンを添加した RPMI1640 培地で ~7 日間 $30^{\circ}C$ 培養した。培地交換は 2 日おきに行い、一日ごとにガラス管内の虫体を目視で観察した。観察時における回虫の生存は、文献(107)を参考にし、 $37^{\circ}C$ で虫体に物理的刺激を与えて 1 分間の観察を行った際の虫体の動きによって判定した。阻害剤による生存阻害効果の評価は、培養開始からガラス管内の虫体に全く動きがなくなるまでの日数で行った。陰性コントロールとして 2% DMSO、陽性コントロールとして駆虫薬ピランテル $300 \mu M$ 存在下における虫体の動きを観察した。各条件について、合計 10 回の実験を行った。DMSO コ

ントロールと 100 mM シッカニン間における生存日数の統計解析は、両集団間の両側非等分散スチューデント t 検定によって行い、有意水準を $p > 0.05$ とした。

4-3 結果

4-3-1 シッカニンの *A. suum* 呼吸鎖複合体 II

これまでの研究により、50 μM のシッカニンが含まれるプレート培地上で *C. elegans* を培養すると、L3 段階で発達が停止するという知見が得られている(106)。 *P. aeruginosa* ミトコンドリアに対するシッカニンの効果の検証(80)、および本研究 3 章で得られた知見から、シッカニンの第一標的の一つはミトコンドリア呼吸鎖複合体 II と予想される。この結果に着目し、ここでは *C. elegans* と同じく線虫類に属する *A. suum* の呼吸鎖複合体 II(AsSQR)に対してシッカニンの阻害活性を測定した。精製酵素を用いて行った活性測定において、AsSQR に対するシッカニンの IC_{50} は $5.7 \pm 0.5 \text{ nM}$ であった (図 4-1)。ブタ回虫 SQR に対するシッカニンの IC_{50} は文献で 861 μM (80)と報告されていたが、本研究で新たに測定した値は 141 μM であった。この値の違いは、先の文献で用いられているキノン基質がユビキノン 1 であるのに対し、本章の回虫呼吸鎖複合体 II 活性測定ではデシルユビキノンを使用しているためである可能性がある。今回測定された IC_{50} を元にシッカニンの回虫複合体 II に対する選択性を算出すると、ブタの約 21000 倍となった。この選択性は、1-11 で触れた AsSQR 阻害剤フルトラニル(選択性 9000 倍)を大幅に上回っており、シッカニンが抗回虫薬としても有望な化合物である可能性が示唆される。3 章と同様にラインウェーバー・バークプロットでシッカニンの阻害様式を解析すると、LtSQR の場合と同様キノンに対して混合阻害を示した($K_{i1} = 5.2 \pm 1.9 \text{ nM}$ 、 $K_{i2} = 9.9 \pm 3.6 \text{ nM}$ 、図 4-2)。この値を元に算出した酵素活性 99 %阻害濃度は 980 nM である。

4-3-2 *in vitro* におけるシッカニンの抗 *A. suum* 効果

4-3-1 において、シッカニンが高い選択性で *A. suum* 呼吸鎖複合体 II を阻害する事が明らかになった。これを踏まえ、シッカニンが実際に回虫に駆虫効果を示すかを明らかにするため、*in vitro* におけるシッカニンの成虫 *A. suum* に

対する効果を調べた。雌の回虫成虫は感染性を示すようになる受精卵を子宮内に持つことから、本研究では屠殺場から雄の成虫 *A. suum* を入手してシッカニン含有液体培地において培養し、ガラス管内の *A. suum* が死亡するまでの時間を測定した(図 4-3)。虫体の生死の判定は文献を参考に目視で行い(107)、虫体へ物理的刺激を与えた時の反応により判定し、観察開始から 1 分間動きを見せない虫体を死亡とみなした。実験は 10 度行い、阻害剤添加時の培地中で虫体が死亡するまでにかかった日数の平均値を算出した。2% DMSO コントロールにおいて、RPMI1640 培地内の *A. suum* は 7.4 ± 0.8 日間生存した。また駆虫薬であるパモ酸ピランテル 300 μM 存在下で培養した場合、全ての実験で虫体は培養開始翌日までに蠕動運動を停止した。これに対し、100 μM シッカニン存在下で培養した場合、虫体の生存日数は 4.4 ± 1.6 日間であった($N = 10$)。両統計群には統計的に有意な差を認めた($p < 0.05$)。

4-4 考察

精製酵素を用いた酵素学的解析の結果、シッカニンはブタ回虫 *A. suum* の呼吸鎖複合体 II に対して阻害効果を示した。ここで明らかになったシッカニンの AsSQR 阻害効果は、当研究室で以前に見出した化合物フルトラニルを上回っていた。さらに 3 章同様にシッカニンの複合体 II に対する阻害様式を推定すると、やはりキノンに対して混合阻害であった。 K_{i2} (9.9 nM) から導かれる 99 % 活性阻害シッカニン濃度の最大値は 980 nM で、この濃度でシッカニンはブタ SQR を阻害しない。これはシッカニンがトリパノソーマ科原虫に対してのみならず、回虫症やフィラリア症といった寄生性線虫症治療薬としても有望である可能性を示す。そこで、寄生性線虫のモデル生物として *A. suum* を用いてシッカニンの効果を *in vitro* で評価すると、比較的高濃度(100 μM)のシッカニン存在下においては有意に生存日数が減少したものの、駆虫薬パモ酸ピランテルのように即効性のある駆虫効果は見出されなかった。100 μM は反応速度式から予想される酵素 99% 阻害濃度の約 100 倍に相当することから、シッカニンが実際の虫体のミトコンドリアへ到達していないことが予想される。この要因としては、シッカニンが液体培地中に十分に溶解していない、あるいは虫体内部へ吸収されていないことなどが考えられる。この原因としては回虫表面のクチクラ層によるシッカニン吸収の阻害、シッカニンの高い疎水性に起因する液体培地への溶

解度の限界等が考えられるが、回虫の薬剤の取り込み機構を詳細に解析した例は報告されておらず、これらについては今後の更なる研究が必要となる。これを踏まえ、より *in vivo* に近い形でシッカニンの駆虫効果を評価するため、ブタを用いた回虫感染実験を計画している。いずれにせよ、現段階ではシッカニンの回虫に対する駆虫効果は弱く、実際に薬剤として用いるにはシッカニンの投与法の最適化、もしくはシッカニン自体の化学構造の修飾が必要である可能性がある。

ここで詳細にシッカニンの線虫呼吸鎖複合体 II 阻害様式を解明すべく、現在京都工芸繊維大学の原田繁春博士らとの共同研究でシッカニンと *A. suum* 呼吸鎖複合体 II の X 線共結晶構造解析を行っている。呼吸鎖複合体 II 結晶(57)とシッカニンのソーキング、及び X 線放射光(SPRING8、播磨)照射により、現時点で分解能 2.9 Å の X 線回折像が得られ、シッカニンの結合様式が明らかになった。まず 4-3-1 の酵素学的解析から予想された通り、シッカニンの結合部位はキノン結合部位周辺であった。既知の阻害剤フルトラニルの場合と同様、シッカニンも回虫呼吸鎖複合体 II にのみ存在するキノン結合部位周辺疎水性ポケットに存在していた(38)。結合アミノ酸残基においても、フルトラニルと同様に Ip サブユニット 197Trp、CybS サブユニット 107Tyr においてシッカニンは複合体 II との間で水素結合を形成していると予想された。一方でフルトラニルと異なり、CybL サブユニット 76Arg の近傍 3.1 Å でシッカニン芳香環の水酸基が特異的な水素結合を形成していた。フルトラニルの場合、76Arg と化合物の相互作用は、より親和性の弱いロンドン分散力による π - π スタッキングによっており、これがシッカニンのフルトラニルより強い SQR 阻害効果の一因であることが示唆される。さらにブタ SQR に対するシッカニンの低親和性の理由を明らかにするため、ブタ SQR 結晶(61)に対してシッカニンのソーキングを行った。しかし、こちらはキノン結合部位における化合物の電子密度を得ることが出来なかった。この結果は、シッカニンがブタ SQR のキノン結合部位へ侵入できないか、SQR との間の相互作用が極めて弱い事を示唆している。また、ここで明らかになったシッカニンと相互作用する *A. suum* 呼吸鎖複合体 II のアミノ酸残基はトリパノソーマ科原虫 SQR において保存されていないことから(49)、トリパノソーマ科原虫と寄生性線虫ではシッカニンの結合様式が異なる可能性が高い。

第 5 章 総括と今後の展望

本研究を通じて、非病原性トリパノソーマ科原虫 *L. tarentolae* を用いた 12 サブユニット呼吸鎖複合体 II の大量精製法が確立すると共に、12 サブユニット SQR に対する選択的阻害剤としてシッカニンが見い出された。今回得られた知見は、困難であった原虫 SQR の立体構造解析への可能性を開き、将来的には酵素の基質結合部位やサブユニット配置の解明を通じて今後の SBDD による新規抗トリパノソーマ症薬剤開発に大きく貢献すると考えられる。阻害剤シッカニンは初めて見つかった 12 サブユニット SQR 選択的阻害剤であり、RNAi によるノックダウンが利用できない *T. cruzi* やリーシュマニア属における呼吸鎖複合体 II の機能解析にも有用であると考えられる。加えてシッカニンが幅広いトリパノソーマ症の病原体に対して増殖阻害効果を示し、それ自体が極めて有望な薬剤候補化合物である事が示された。これらの結果は、本研究で新たに用いたマイクロプレートリーダーによる 12 サブユニット SQR 阻害剤スクリーニング系が、今後原虫呼吸鎖複合体 II の阻害剤をより大きな規模で行う上で有用なツールとなり得る事を示している。

また今回見出したシッカニンはトリパノソーマ科原虫のみならず、寄生性線虫のモデル生物であるブタ回虫の SQR を強力に阻害した。トリパノソーマ症が流行する中南米、アジア、アフリカの発展途上国においては、衛生環境の不備から回虫症やフィラリア症といった寄生性線虫症が大きな被害をもたらしており、これら全てに対して効果を示したシッカニンは、熱帯寄生虫症の制圧において大きく貢献できる可能性を有している。

しかし、既に抗水虫薬として実用化がされているものの、シッカニンの内服薬としての効果とヒトへの毒性は確かめられておらず、*in vivo* の動物実験もなされていない。さらに回虫の虫体への駆虫効果は、今回の簡易的なアッセイ系では酵素レベルでの阻害効果に比べて低く算出されたことから、寄生性線虫症に対するシッカニンの応用には化合構造の改善が必要な可能性がある。また、シッカニンが LtSQR のどのサブユニットと相互作用しているかは、現時点では分かっておらず、各サブユニットの機能もわかっていない。

現在当グループでは、本研究で確立した精製法を用いて、LtSQR の立体構造解析に取り組み、複合体 II とシッカニンの相互作用を原子レベルでの解明を目指している。さらにシッカニンの抗トリパノソーマ科原虫薬としての実用化を目指し、*in vivo* における動物実験を計画中である。また、シッカニンの *A. suum*

呼吸鎖複合体 II に対する強力な阻害効果を踏まえ、フィラリアや捻転胃虫、エキノコックスといったフマル酸呼吸系が保存された蠕虫に対するシッカニンの効果も調べる予定である。これらの目的のためには、大量のシッカニンの調製が必要であるが、シッカニンの全化学合成経路はステップ数が多く大量合成に不向きなため(108)、現在シッカニン産生菌 *Helminthosporium siccans* の培養(91)によるシッカニンの大量抽出を行っている。

参考文献

1. R. Brun, J. Blum, F. Chappuis, C. Burri, Human African trypanosomiasis. *Lancet* 375, 148-159 (2010).
2. N. Acestor *et al.*, Trypanosoma brucei mitochondrial respiratome: composition and organization in procyclic form. *Mol Cell Proteomics* 10, M110.006908 (2011).
3. A. Rassi, J. A. Marin-Neto, Chagas disease. *Lancet* 375, 1388-1402 (2010).
4. D. Katiyar, L. K. Singh, Filariasis: Current status, treatment and recent advances in drug development. *Curr Med Chem* 18, 2174-2185 (2011).
5. N. Singh, M. Kumar, R. K. Singh, Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med* 5, 485-497 (2012).
6. S. R. Wilkinson, J. M. Kelly, Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med* 11, e31 (2009).
7. R. Docampo, S. N. Moreno, Current chemotherapy of human African trypanosomiasis. *Parasitol Res* 90 Supp 1, S10-13 (2003).
8. A. Pal, B. S. Hall, M. C. Field, Evidence for a non-LDL-mediated entry route for the trypanocidal drug suramin in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* 122, 217-221 (2002).
9. W. D. Wilson *et al.*, Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie* 90, 999-1014 (2008).
10. T. A. Shapiro, P. T. Englund, Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 950-954 (1990).
11. H. P. de Koning, S. M. Jarvis, Uptake of pentamidine in Trypanosoma brucei brucei is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Trop* 80, 245-250 (2001).
12. H. P. De Koning, Uptake of pentamidine in Trypanosoma brucei brucei is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. *Mol Pharmacol* 59, 586-592 (2001).
13. B. Enanga, R. J. Burchmore, M. L. Stewart, M. P. Barrett, Sleeping sickness and the brain. *Cell Mol Life Sci* 59, 845-858 (2002).
14. E. Matovu *et al.*, Genetic variants of the TbAT1 adenosine transporter from African trypanosomes in relapse infections following melarsoprol therapy. *Mol Biochem Parasitol* 117, 73-81 (2001).
15. S. M. Murta, R. T. Gazzinelli, Z. Brener, A. J. Romanha, Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of Trypanosoma cruzi to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 93, 203-214 (1998).

16. B. S. Hall, C. Bot, S. R. Wilkinson, Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem* 286, 13088-13095 (2011).
17. J. Chakravarty, S. Sundar, Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2, 167-176 (2010).
18. C. Yeates, Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs* 3, 1446-1452 (2002).
19. J. D. Berman *et al.*, Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. *Bull World Health Organ* 76, 25-32 (1998).
20. C. W. Roberts *et al.*, Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 126, 129-142 (2003).
21. F. J. Pérez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro, Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2397-2403 (2003).
22. P. Escobar, S. Matu, C. Marques, S. L. Croft, Sensitivities of Leishmania species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop* 81, 151-157 (2002).
23. T. P. Dorlo, M. Balasegaram, J. H. Beijnen, P. J. de Vries, Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 67, 2576-2597 (2012).
24. J. R. Luque-Ortega, L. Rivas, Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in Leishmania donovani promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1327-1332 (2007).
25. B. Purkait *et al.*, Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 1031-1041 (2012).
26. K. P. Luna *et al.*, In vitro susceptibility of Trypanosoma cruzi strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomedica* 29, 448-455 (2009).
27. N. Baker, H. P. de Koning, P. Mäser, D. Horn, Drug resistance in African trypanosomiasis: the melarsoprol and pentamidine story. *Trends Parasitol* 29, 110-118 (2013).
28. F. Bringaud, L. Rivière, V. Coustou, Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 149, 1-9 (2006).
29. Y. Kido *et al.*, Crystallization and preliminary crystallographic analysis of

- cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 66, 275-278 (2010).
30. Y. Yabu *et al.*, The efficacy of ascofuranone in a consecutive treatment on *Trypanosoma brucei brucei* in mice. *Parasitol Int* 52, 155-164 (2003).
 31. F. R. Oppendoes, G. H. Coombs, Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol* 23, 149-158 (2007).
 32. J. J. Cazzulo, Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *FASEB J* 6, 3153-3161 (1992).
 33. P. A. Michels, F. Bringaud, M. Herman, V. Hannaert, Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1463-1477 (2006).
 34. G. Vyatkina, V. Bhatia, A. Gerstner, J. Papaconstantinou, N. Garg, Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development. *Biochim Biophys Acta* 1689, 162-173 (2004).
 35. S. Surve, M. Heestand, B. Panicucci, A. Schnauffer, M. Parsons, Enigmatic presence of mitochondrial complex I in *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. *Eukaryot Cell* 11, 183-193 (2012).
 36. E. Perez *et al.*, The mitochondrial respiratory chain of the secondary green alga *Euglena gracilis* shares many additional subunits with parasitic Trypanosomatidae. *Mitochondrion*, (2014).
 37. G. Cecchini, Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem* 72, 77-109 (2003).
 38. S. Harada, D. K. Inaoka, J. Ohmori, K. Kita, Diversity of parasite complex II. *Biochim Biophys Acta* 1827, 658-667 (2013).
 39. R. Horsefield, S. Iwata, B. Byrne, Complex II from a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci* 5, 107-118 (2004).
 40. C. Sakai, E. Tomitsuka, H. Esumi, S. Harada, K. Kita, Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1820, 643-651 (2012).
 41. P. C. Mowery, D. J. Steenkamp, A. C. Ackrell, T. P. Singer, G. A. White, Inhibition of mammalian succinate dehydrogenase by carboxins. *Arch Biochem Biophys* 178, 495-506 (1977).
 42. J. T. Ulrich, D. E. Mathre, Mode of action of oxathiin systemic fungicides. V. Effect on electron transport system of *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 110, 628-632 (1972).
 43. Y. Ito, H. Muraguchi, Y. Seshime, S. Oita, S. O. Yanagi, Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome b560

- subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II). *Mol Genet Genomics* 272, 328-335 (2004).
44. H. Ishii, T. Miyamoto, S. Ushio, M. Kakishima, Lack of cross-resistance to a novel succinate dehydrogenase inhibitor, fluopyram, in highly boscalid-resistant isolates of *Corynespora cassiicola* and *Podosphaera xanthii*. *Pest Manag Sci* 67, 474-482 (2011).
 45. K. Kita, C. Nihei, E. Tomitsuka, Parasite mitochondria as drug target: diversity and dynamic changes during the life cycle. *Curr Med Chem* 10, 2535-2548 (2003).
 46. L. Carvalho *et al.*, Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets leishmania respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 5344-5351 (2010).
 47. L. Carvalho *et al.*, The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 4204-4210 (2011).
 48. R. M. Martins, C. Covarrubias, R. G. Rojas, A. M. Silber, N. Yoshida, Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect Immun* 77, 3023-3032 (2009).
 49. J. Morales *et al.*, Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. *J Biol Chem* 284, 7255-7263 (2009).
 50. M. Berriman *et al.*, The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309, 416-422 (2005).
 51. N. M. El-Sayed *et al.*, The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409-415 (2005).
 52. A. C. Ivens *et al.*, The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442 (2005).
 53. H. Eubel, J. Heinemeyer, S. Sunderhaus, H. P. Braun, Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 42, 937-942 (2004).
 54. A. K. Agarwal, C. W. Fishwick, Structure-based design of anti-infectives. *Ann N Y Acad Sci* 1213, 20-45 (2010).
 55. S. B. Falconer, E. D. Brown, New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Curr Opin Microbiol* 12, 497-504 (2009).
 56. A. K. Datta, R. Datta, B. Sen, Antiparasitic chemotherapy: tinkering with the purine salvage pathway. *Adv Exp Med Biol* 625, 116-132 (2008).
 57. A. Osanai *et al.*, Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with the specific inhibitor flutolanil. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 65, 941-944 (2009).

58. H. Shimizu *et al.*, Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. *J Biochem* 151, 589-592 (2012).
59. J. Ruprecht, V. Yankovskaya, E. Maklashina, S. Iwata, G. Cecchini, Structure of *Escherichia coli* succinate:quinone oxidoreductase with an occupied and empty quinone-binding site. *J Biol Chem* 284, 29836-29846 (2009).
60. L. S. Huang, J. T. Shen, A. C. Wang, E. A. Berry, Crystallographic studies of the binding of ligands to the dicarboxylate site of Complex II, and the identity of the ligand in the "oxaloacetate-inhibited" state. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1073-1083 (2006).
61. F. Sun *et al.*, Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121, 1043-1057 (2005).
62. T. M. Iverson, C. Luna-Chavez, G. Cecchini, D. C. Rees, Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* 284, 1961-1966 (1999).
63. C. R. Lancaster, *Wolinella succinogenes* quinol:fumarate reductase-2.2-A resolution crystal structure and the E-pathway hypothesis of coupled transmembrane proton and electron transfer. *Biochim Biophys Acta* 1565, 215-231 (2002).
64. H. Miyadera *et al.*, Complex II from phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* displays rhodoquinol-fumarate reductase activity. *Eur J Biochem* 270, 1863-1874 (2003).
65. B. Zingales *et al.*, Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener--the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92, 811-814 (1997).
66. J. G. De Gaudenzi, G. Noé, V. A. Campo, A. C. Frasch, A. Cassola, Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem* 51, 31-46 (2011).
67. I. D. Tkacz *et al.*, Analysis of spliceosomal proteins in Trypanosomatids reveals novel functions in mRNA processing. *J Biol Chem* 285, 27982-27999 (2010).
68. C. Fritsche, M. Sitz, N. Weiland, R. Breitling, H. D. Pohl, Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae*: a new expression system for recombinant proteins. *J Basic Microbiol* 47, 384-393 (2007).
69. R. Graziose *et al.*, Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. *J Ethnopharmacol* 142, 456-461 (2012).
70. V. M. Taylor *et al.*, *Leishmania tarentolae*: utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents. *Exp Parasitol* 126, 471-475 (2010).
71. T. L. Turner *et al.*, Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in vitro. *J Inorg Biochem* 108, 96-104 (2012).

72. D. O. Guimarães *et al.*, Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52, 134-144 (2008).
73. I. Wittig, M. Karas, H. Schägger, High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics* 6, 1215-1225 (2007).
74. I. Wittig, R. Carrozzo, F. M. Santorelli, H. Schägger, Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* 28, 3811-3820 (2007).
75. H. Schägger, Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1, 16-22 (2006).
76. D. Rosenzweig *et al.*, Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J* 22, 590-602 (2008).
77. M. A. Morales *et al.*, Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8381-8386 (2010).
78. R. Horsefield *et al.*, Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *J Biol Chem* 281, 7309-7316 (2006).
79. T. Shiba *et al.*, Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 4580-4585 (2013).
80. T. Mogi *et al.*, Siccanin rediscovered as a species-selective succinate dehydrogenase inhibitor. *J Biochem* 146, 383-387 (2009).
81. R. Eisenthal, A. Cornish-Bowden, The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem J* 139, 715-720 (1974).
82. B. Răz, M. Iten, Y. Grether-Bühler, R. Kaminsky, R. Brun, The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) in vitro. *Acta Trop* 68, 139-147 (1997).
83. T. Nara *et al.*, Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. *Parasitol Int* 54, 59-64 (2005).
84. M. Lahouel *et al.*, Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochem Biophys Res Commun* 355, 252-257 (2007).
85. K. Nose, A. Endo, Mode of action of the antibiotic siccanin on intact cells and mitochondria of *Trichophyton mentagrophytes*. *J Bacteriol* 105, 176-184 (1971).

86. M. Zakikhani *et al.*, Alterations in cellular energy metabolism associated with the antiproliferative effects of the ATM inhibitor KU-55933 and with metformin. *PLoS One* 7, e49513 (2012).
87. J. Matsumoto *et al.*, 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 (2008).
88. J. T. Mesquita, E. G. Pinto, N. N. Taniwaki, A. J. Galisteo, A. G. Tempone, Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in *Leishmania (L.) infantum*. *Acta Trop* 128, 666-673 (2013).
89. M. Fry, M. Pudney, Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* 43, 1545-1553 (1992).
90. D. Birth, W. C. Kao, C. Hunte, Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action. *Nat Commun* 5, 4029 (2014).
91. K. ISHIBASHI, STUDIES ON ANTIBIOTICS FROM HELMINTHOSPORIUM SP. FUNGI .7. SICCANIN, A NEW ANTIFUNGAL ANTBIOTIC PRODUCED BY HELMINTHOSPORIUM SICCANS. *Journal of Antibiotics* 15, 161-& (1962).
92. B. H. Nadia *et al.*, Disruption of mitochondrial membrane potential by ferulenol and restoration by propolis extract: antiapoptotic role of propolis. *Acta Biol Hung* 60, 385-398 (2009).
93. K. Hirai, S. Okuda, S. Nozoe, Y. Iitaka, The crystal and molecular structure of siccanin p-bromobenzenesulphonate. *Acta Crystallogr B* 25, 2630-2638 (1969).
94. M. V. Berridge, A. S. Tan, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474-482 (1993).
95. S. W. van Weelden *et al.*, Procyclic *Trypanosoma brucei* do not use Krebs cycle activity for energy generation. *J Biol Chem* 278, 12854-12863 (2003).
96. J. J. van Hellemond, F. R. Opperdoes, A. G. Tielens, The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Trans* 33, 967-971 (2005).
97. D. Sylvester, S. M. Krassner, Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B* 55, 443-447 (1976).
98. N. Lamour *et al.*, Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is

- down-regulated in the presence of glucose. *J Biol Chem* 280, 11902-11910 (2005).
99. S. W. van Weelden, J. J. van Hellemond, F. R. Oppendoes, A. G. Tielens, New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle. *J Biol Chem* 280, 12451-12460 (2005).
 100. V. Coustou *et al.*, Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 283, 16342-16354 (2008).
 101. E. Takashima *et al.*, Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 122, 189-200 (2002).
 102. J. A. Urbina, J. L. Concepcion, S. Rangel, G. Visbal, R. Lira, Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 125, 35-45 (2002).
 103. J. A. Urbina, Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 311-318 (2009).
 104. S. Omura *et al.*, An anthelmintic compound, nafuredin, shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 60-62 (2001).
 105. R. M. Kaplan, Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20, 477-481 (2004).
 106. D. Yamamuro, R. Uchida, Y. Takahashi, R. Masuma, H. Tomoda, Screening for microbial metabolites affecting phenotype of *Caenorhabditis elegans*. *Biol Pharm Bull* 34, 1619-1623 (2011).
 107. Y. Hu *et al.*, An extensive comparison of the effect of anthelmintic classes on diverse nematodes. *PLoS One* 8, e70702 (2013).
 108. B. M. Trost, H. C. Shen, J. P. Surivet, Biomimetic enantioselective total synthesis of (-)-siccanin via the Pd-catalyzed asymmetric allylic alkylation (AAA) and sequential radical cyclizations. *J Am Chem Soc* 126, 12565-12579 (2004).

謝辞

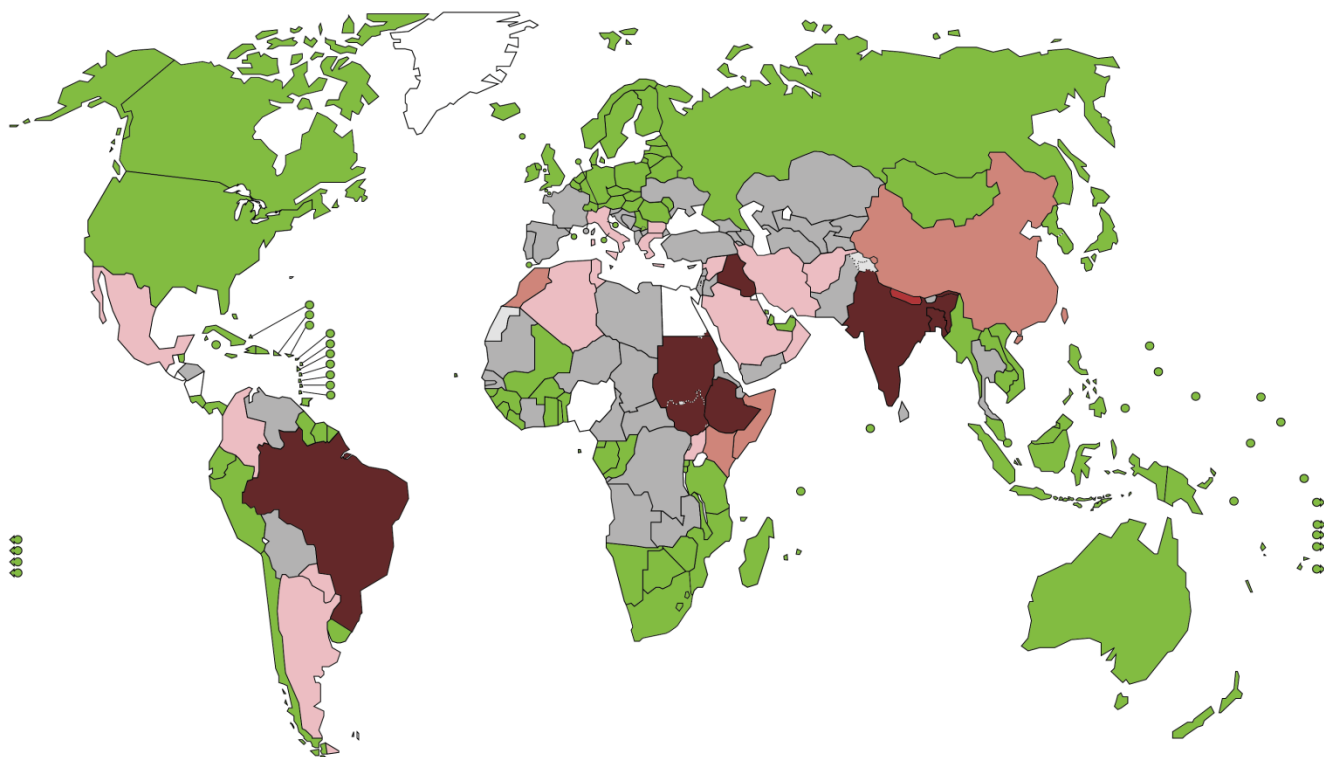
本研究を行うに当たり、多くの方々に多大なるご助言とご助力を頂きました。取り分け研究活動全般をご指導いただきました東京大学大学院医学系研究科生物医化学教室の北潔博士と稲岡ダニエル健博士、そして同教室員の方々に深く御礼申し上げます。また本論文をまとめるに当たり暖かく励まして下さいました埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子治療部門の方々に、心より御礼申し上げます。

図・表

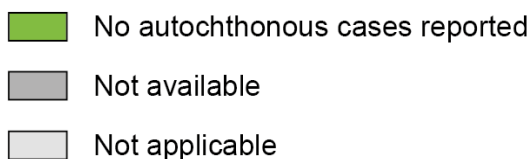
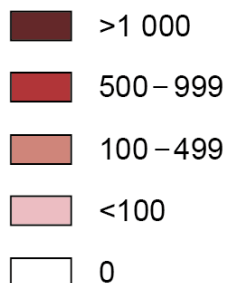


The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2014. All rights reserved

図1-1 リンパ系フィラリア症の分布 2013年におけるリンパ系フィラリアの分布を示した(WHO, http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/LF_2013.pngより転載)。緑色の地域がWHOによる集団的な化学療法が行われている流行地、水色が既にWHOが化学療法を終了した流行地、灰色が流行地でありながら化学療法プログラムが行われていない流行地、白が非流行地である。



Number of new VL cases reported, 2012



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

図1-2 内臓リーシュマニア症の分布 2012年における内臓リーシュマニア症の分布を示した (WHO, http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png より転載)。

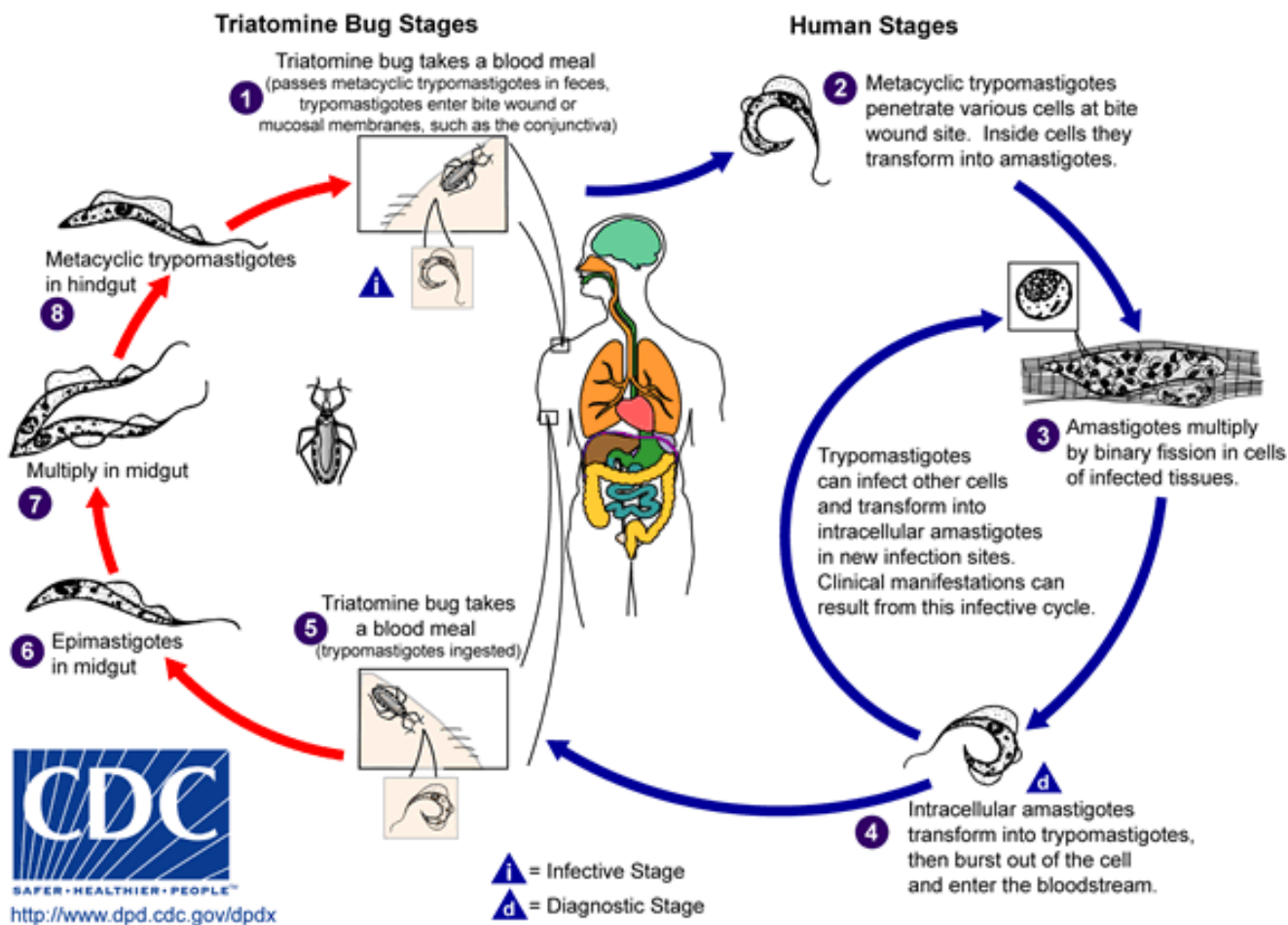


図1-3 *T. cruzi*の生活環 *T. cruzi*はサシガメによって媒介され、ヒトを含む150種類の哺乳類を宿主とする。 <http://www.dpd.cdc.gov/>より転載した。

Tsetse fly Stages

Epimastigotes multiply in salivary gland. They transform into metacyclic trypomastigotes.

8

7 Procyclic trypomastigotes leave the midgut and transform into epimastigotes.

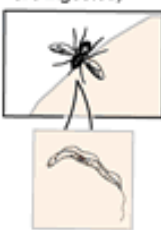
6 Bloodstream trypomastigotes transform into procyclic trypomastigotes in tsetse fly's midgut. Procyclic tryposmatigotes multiply by binary fission.

1 Tsetse fly takes a blood meal (injects metacyclic trypomastigotes)



i

5 Tsetse fly takes a blood meal (bloodstream trypomastigotes are ingested)



i

d

Human Stages

2 Injected metacyclic trypomastigotes transform into bloodstream trypomastigotes, which are carried to other sites.

3 Trypomastigotes multiply by binary fission in various body fluids, e.g., blood, lymph, and spinal fluid.

4 Trypomastigotes in blood

i = Infective Stage

d = Diagnostic Stage



<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

図1-4 *T. brucei*の生活環 *T. brucei*はツェツェバエによって媒介される。
<http://www.dpd.cdc.gov/>より転載した。

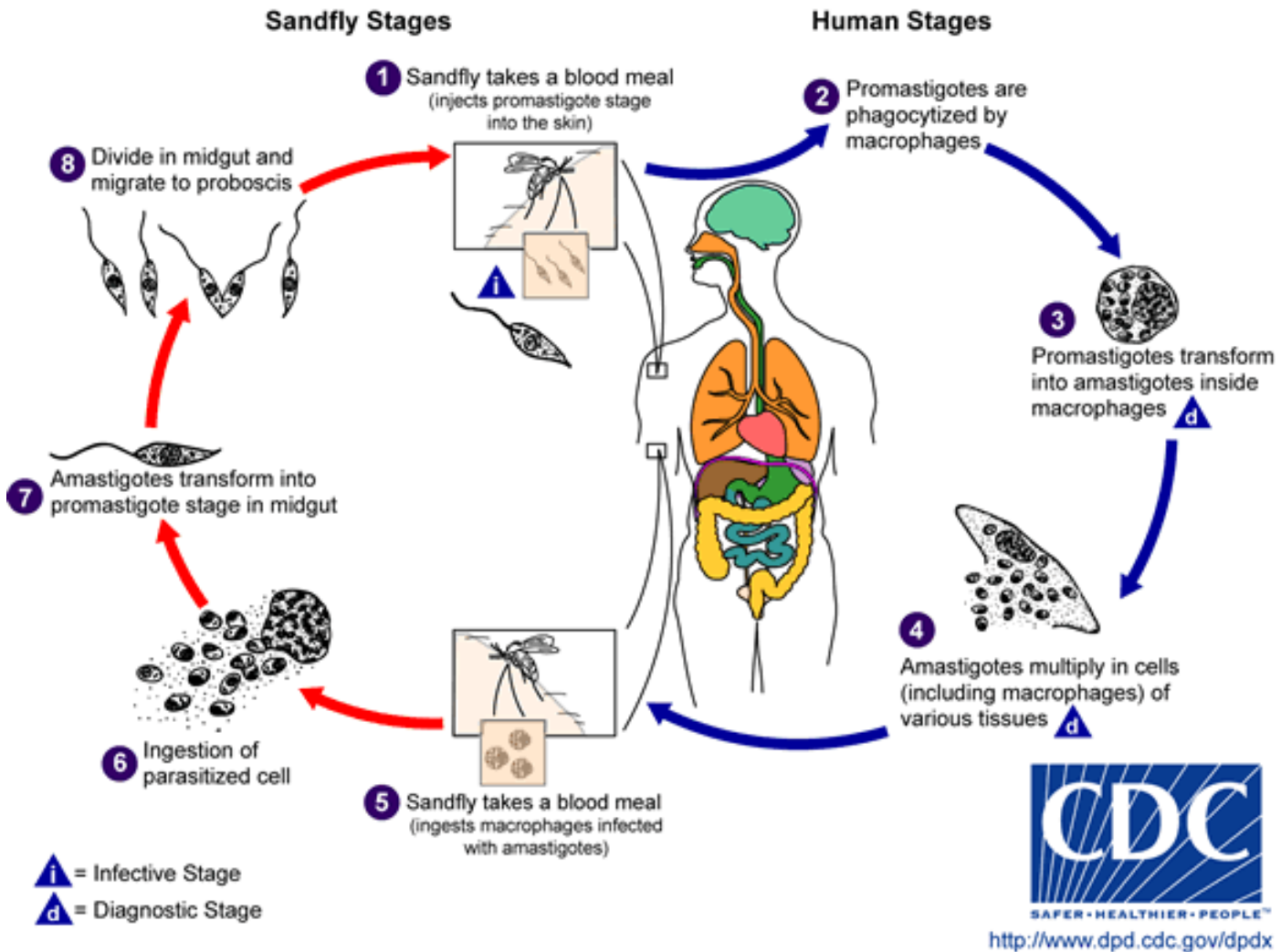


図1-5 リーシュマニア属原虫の生活環 リーシュマニア属原虫はサシチョウバエによって媒介され、哺乳類宿主のマクロファージで増殖する。
<http://www.dpd.cdc.gov/>より転載した。

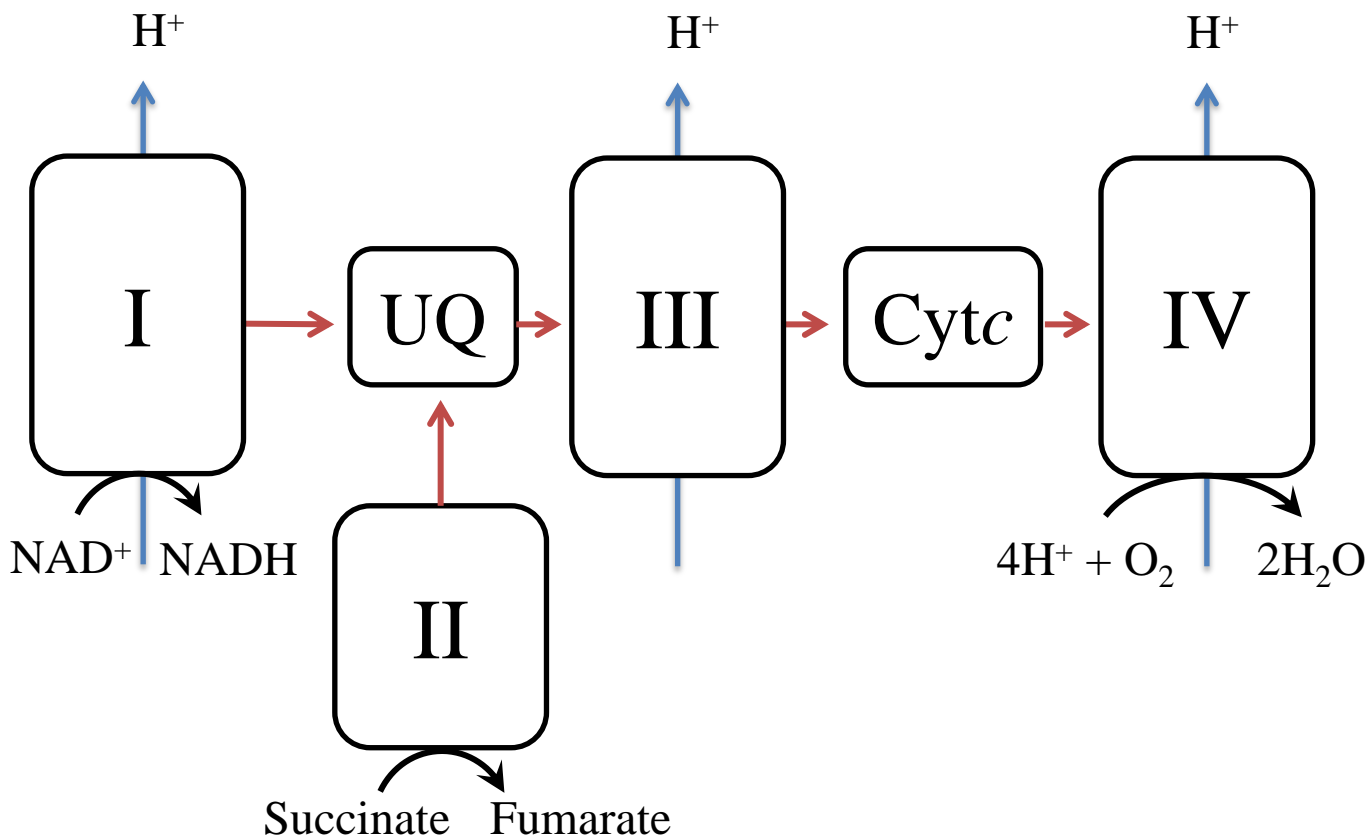


図1-6 ミトコンドリア呼吸鎖 ヒトを含む多くの生物において、好氣的条件下のエネルギー産生ではミトコンドリア呼吸鎖が重要な役割を果たす。まず解糖系とTCA回路により生じた NADH から複合体Iが、コハク酸から複合体IIが電子を奪い、膜内に存在する疎水性の基質キノンをキノールへと還元する。キノールは複合体IIIによりキノンへ再酸化され、電子を酸化型シトクロム c に受け渡す。還元されたシトクロム c は末端酸化酵素の複合体IVにより酸化され、最終電子受容体である酸素を水に還元する。複合体I、II、IVはプロトンポンプ活性を持ち、ATP合成に必要なプロトン濃度勾配を形成する。

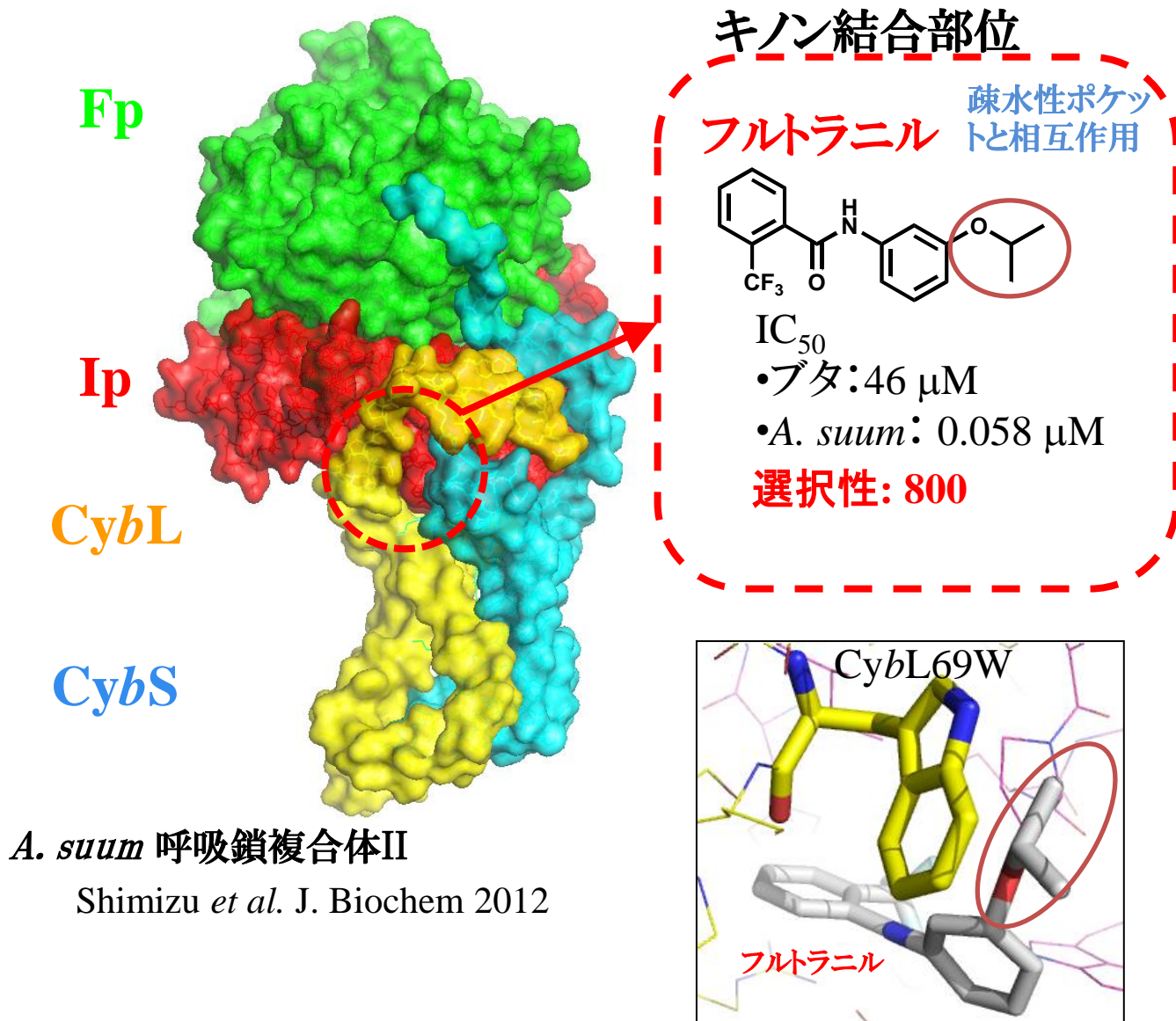


図1-7 ブタ回虫*A. suum*呼吸鎖複合体IIと選択的阻害剤フルトラニル ブタ回虫呼吸鎖複合体IIのX線結晶構造 (3VR8)と、その選択的阻害剤フルトラニルの構造を示した。豚回虫複合体IIは哺乳類と同様に4サブユニットで構成されているが、ユビキノンだけでなく低電位のロドキノンもキノン結合部位で認識する。回虫選択的阻害剤フルトラニルはブタと回虫の両方のキノン結合部位と相互作用するが、回虫呼吸鎖複合体IIとフルトラニルの複合体(3VRA)では化合物のイソプロポキシ基(赤丸部分)が回虫特異的な疎水性ポケット付近に位置してCybLサブユニット69番トリプトファンと疎水性な結合を形成していた。そこで薬剤開発ではこのイソプロピル基の伸長と修飾をポケット方向へ向かう形で行うことで、最終的には選択性約80,000倍の化合物を見出した(未発表)。

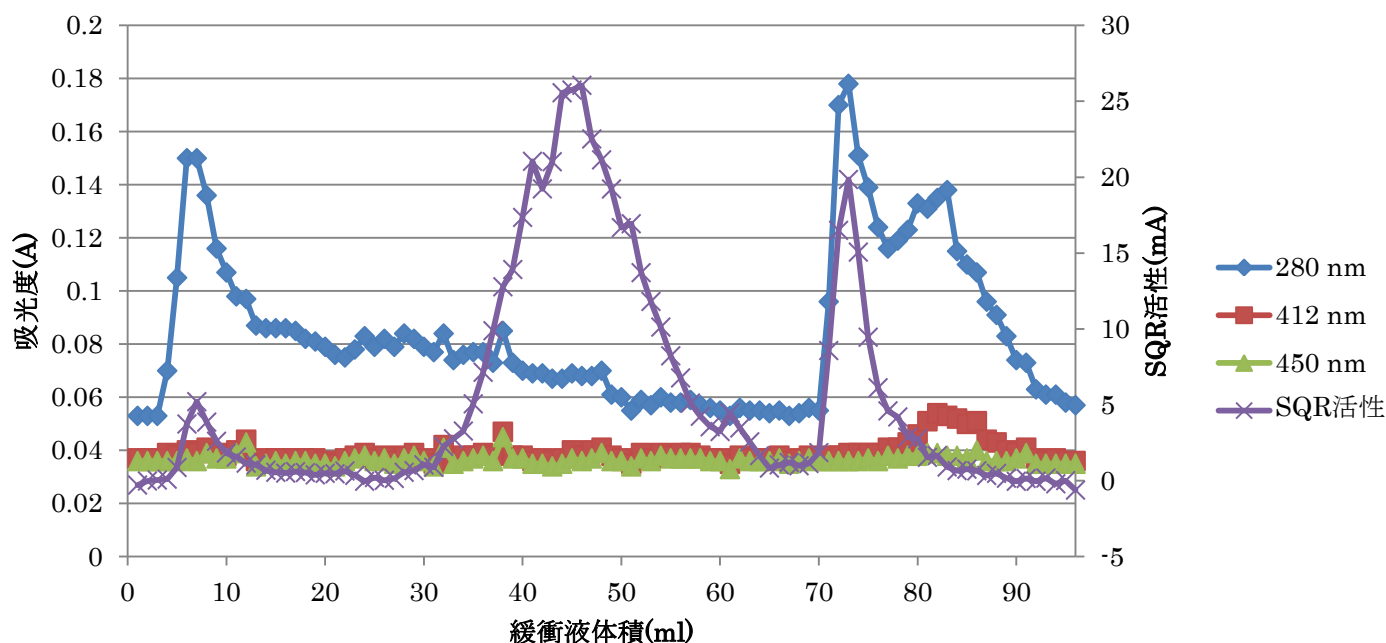
遺伝子	<i>L. tarentolae</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. b. brucei</i>	<i>L. major</i>	<i>L. donovani</i>
SDH1	67	67 (90)	67(89)	67 (98)	67 (98)
SDH2 _N	27	32 (62)	27(64)	27 (94)	27 (95)
SDH2 _C	22	21 (72)	21(76)	22 (89)	22 (97)
SDH3	12	8 (73)	12(61)	12 (94)	12 (95)
SDH4	16	14 (48)	14 (59)	16 (85)	16 (85)
SDH5	53	53 (44)	53(42)	53 (91)	53 (91)
SDH6	37	36 (50)	37(50)	37 (85)	37 (86)
SDH7	29	28 (53)	28 (55)	29 (89)	29 (89)
SDH8	17	16 (65)	17(60)	17 (95)	17 (93)
SDH9	16	16 (58)	16(79)	16 (81)	16 (81)
SDH10	16	16 (50)	14(60)	16 (85)	16 (87)
SDH11	10	10 (50)	10(77)	10 (85)	10 (89)
M.W. (kDa)	323	319	323	323	323

表2-1 12サブユニットの呼吸鎖複合体IIの分子量と相同性 ゲノム解析結果から推定される *L. tarentolae* SQRサブユニット分子量を示した。0内の数字はLtSQR遺伝子に対する他のトリパノソーマ科原虫由来SQRオルソログのアミノ酸配列の同一性で、50%以上を青、80%以上を赤で表している。

	タンパク質 (g)	SQR 全活性 (U)	SQR 比活性 (mU/mg)
<i>T. cruzi</i>	0.31	27	85
<i>L. tarentolae</i>	2.9	340	113

表2-2 YE培地10 Lからの*L. tarentolae*ミトコンドリア画分調製 *T. cruzi* LIT培地10 L培養[49]および*L. tarentolae* YE培地10 L培養から得られたミトコンドリア画分のSQR収量とSQR比活性を示した。SQR活性の単位はU = $\mu\text{mol}/\text{min}$ である。

A. クロマトグラム

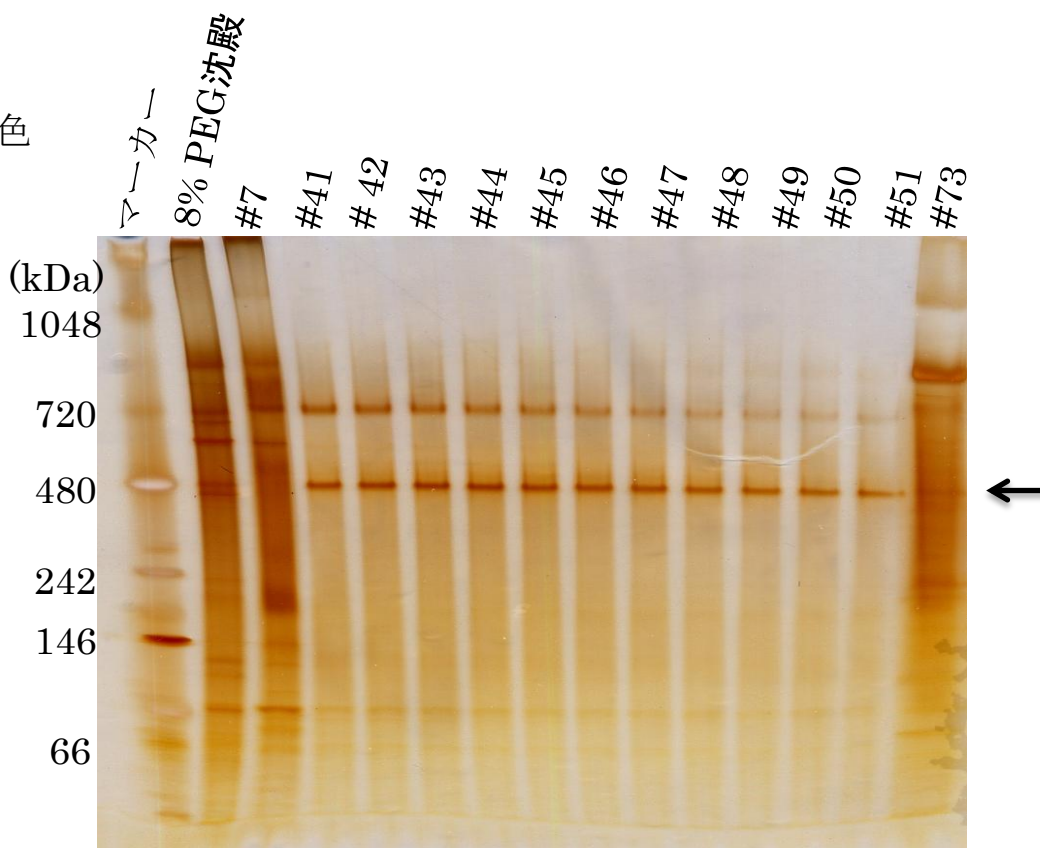


B. 精製

精製ステップ	タンパク質(mg)	SQR全活性(U)	SQR比活性(U/mg)	全活性収率(%)	精製度
ミトコンドリア	90	4.1	0.045	100	1
SML可溶化	50	4.8	0.096	117	2.1
PEG3350沈殿	11	2.3	0.22	57	7.0
DDM交換(#39-46)	0.10	0.29	2.8	7.1	61
DDM交換 (#47-51)	0.060	0.14	2.3	3.5	51

図2-1 20% (v/v)グリセロール添加時のDDM界面活性剤置換1 *L. tarentolae*
 ミトコンドリアから2-3-2に従ってLtSQRの部分精製を行った。(A)はEDM
 fractogel DEAEカラムによるLtSQR溶出ピーク、(B)は精製テーブルを意味する。
 活性収率はミトコンドリア時を100%とするSQR全活性、精製度はミトコンドリア時の数値を1とした時の標品SQR比活性である。

A. 銀染色



B. SDH活性染色

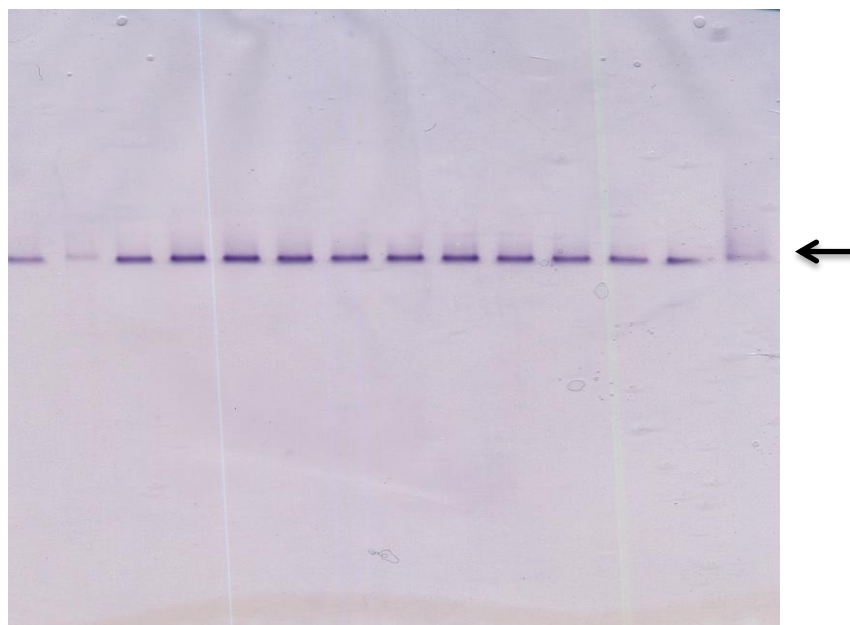
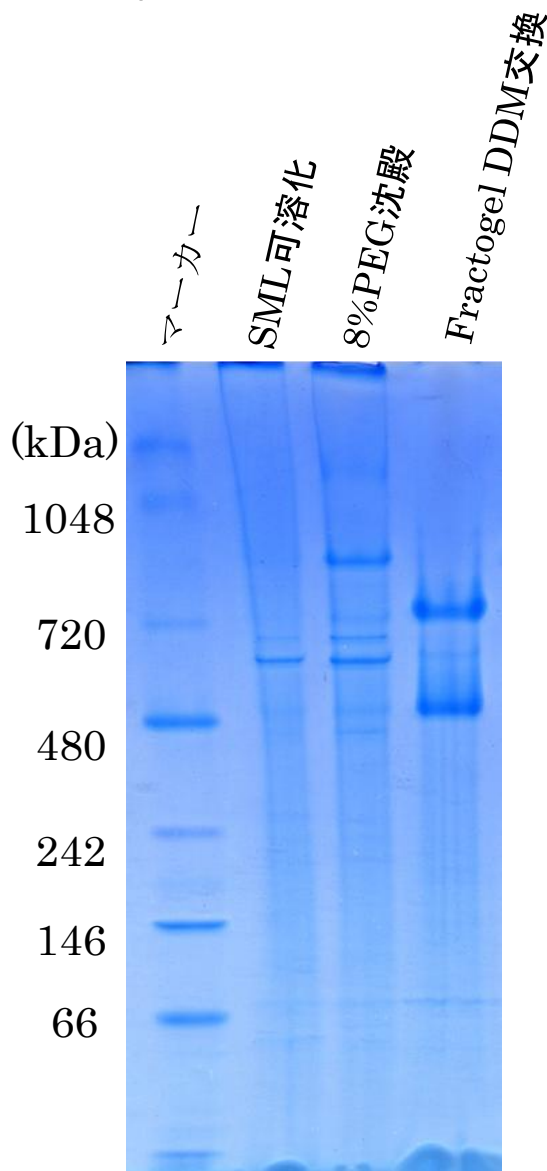
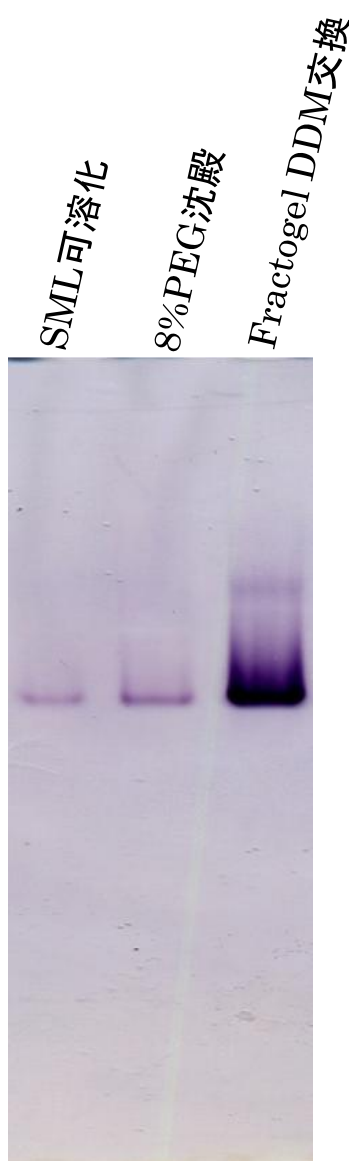


図2-2 カラム精製時溶出フラクションのhrCNE 図2-1で溶出した各画分からSQRピーク画分を選んで4-16% hrCNEを行なった。この際、比較対象として8% (w/v) PEG3350沈殿直後の標品も泳動した。溶出画分は1レーンあたり10 μ l、PEG沈殿物は1レーンに2 μ g で、泳動後のゲルは銀染色(A)およびSDH活性染色(B)で染色した。図中の黒矢印はLtSQRの位置を表している。

A. CBB染色



B. SDH活性染色



C. TcSQRとLtSQRの総分子量比較

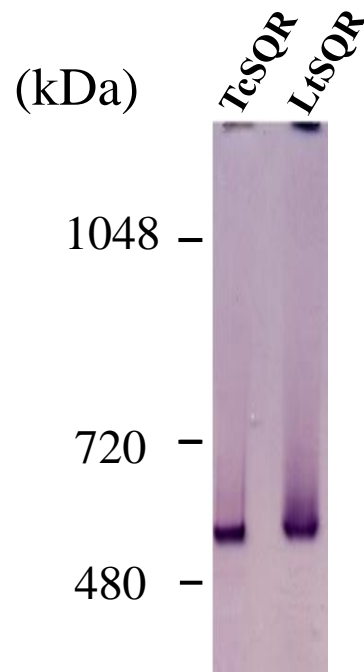


図2-3 精製LtSQRのゲル解析 図2-1のSML可溶化画分、8% (w/v) PEG3350沈殿画分、Fractogel 溶出画分(フラクション39~46)を用いて4-16% hrCNEを行なった。泳動標品は1レーンあたり10 μ gで、泳動後のゲルはCBB染色(A)またはSDH活性染色(B)で染色した。さらに可溶化画分を用いてTcSQRとLtSQRの全分子量を比較した(C)。TcSQRの数値は[49]による。



図2-4 質量分析におけるL_tSDHサブユニット同定 図2-3のSDH活性染色後のゲルからバンドを切り抜き、12.5 %トリシンゲルで再泳動した。ゲルをCBB染色後、各バンドをLC-MS/MS解析した。

阻害剤	IC ₅₀ (μM)				
	<i>L. tarentolae</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. b. brucei</i>	<i>L. donovani</i>	ブタ
マロン酸	63.9	32.5	81.8	46.7	65
アトペニン A5	7.1	13.1	10.9	6.5	0.005
カルボキシ ン	>100	>100	>100	>100	23.3
TTFA	>100	>100	>100	>100	23.6

表3-1 トリパノソーマ科原虫SQRの呼吸鎖複合体II阻害剤に対する感受性の比較
 3-2-1にある通り、マイクロプレートリーダーによりマロン酸、アトペニンA5、
 カルボキシシン、TTFA、HQNOに対するトリパノソーマ科原虫SQR活性の感受性
 を測定した。

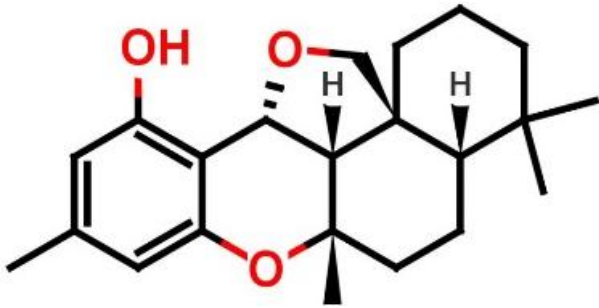
化合物	LtSQR IC ₅₀ (μM)
ロテノン	>50
シッカニン	0.19
フェルレノール	5.3
フルオピラム	>50
ニタゾキサミド	>50
フルトラニル	>50
KU-55933	>50
アトバコン	>50
アンチマイシンA	>50
アスコフラノン	>50
ニフロチモックス	>50

表3-2 *L. tarentolae*呼吸鎖複合体II (LtSQR)活性に対する阻害効果を測定した化合物

生物	IC ₅₀ (μM)		形態
	SQR	細胞	
ブタ*	861	-	-
<i>T. cruzi</i>	1.4	10	Amastigote
<i>T. b. brucei</i>	0.37	8.3	血流型
<i>L. tarentolae</i>	0.19	4.4	Promastigote
<i>L. donovani</i>	1.17	0.7	Promastigote
<i>L. major</i>	-	13	Promastigote

表3-3 シッカニンによるトリパノソーマ科原虫**SQR**および原虫の増殖に対する阻害効果のまとめ ブタSQR阻害は[41]による。

A. シッカニン



B. シッカニンの
酵素活性阻害

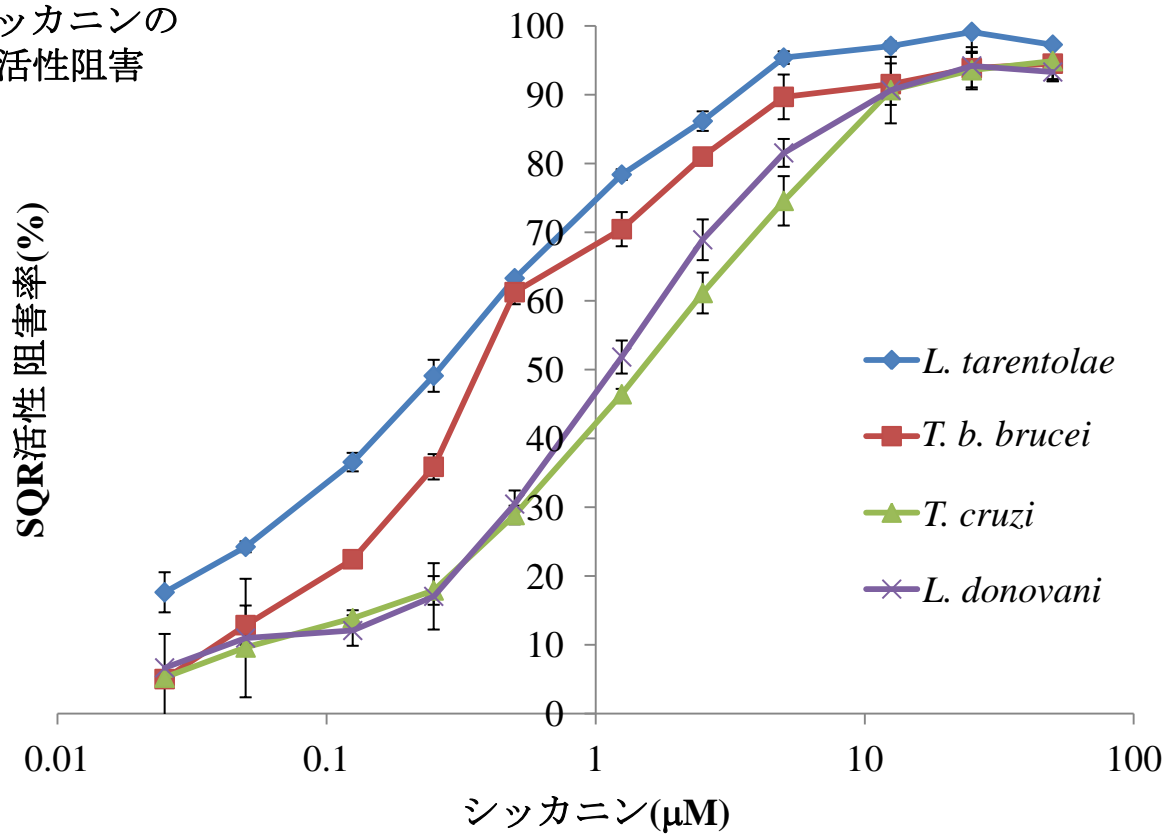


図3-1 シッカニンのトリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体II阻害 A. シッカニンの構造式を示した。B. *L. tarentolae*、*T. b. brucei*、*T. cruzi*と*L. donovani*ミトコンドリアのSQR活性をマイクロプレートで測定し、阻害曲線からシッカニンのIC₅₀を算出した。

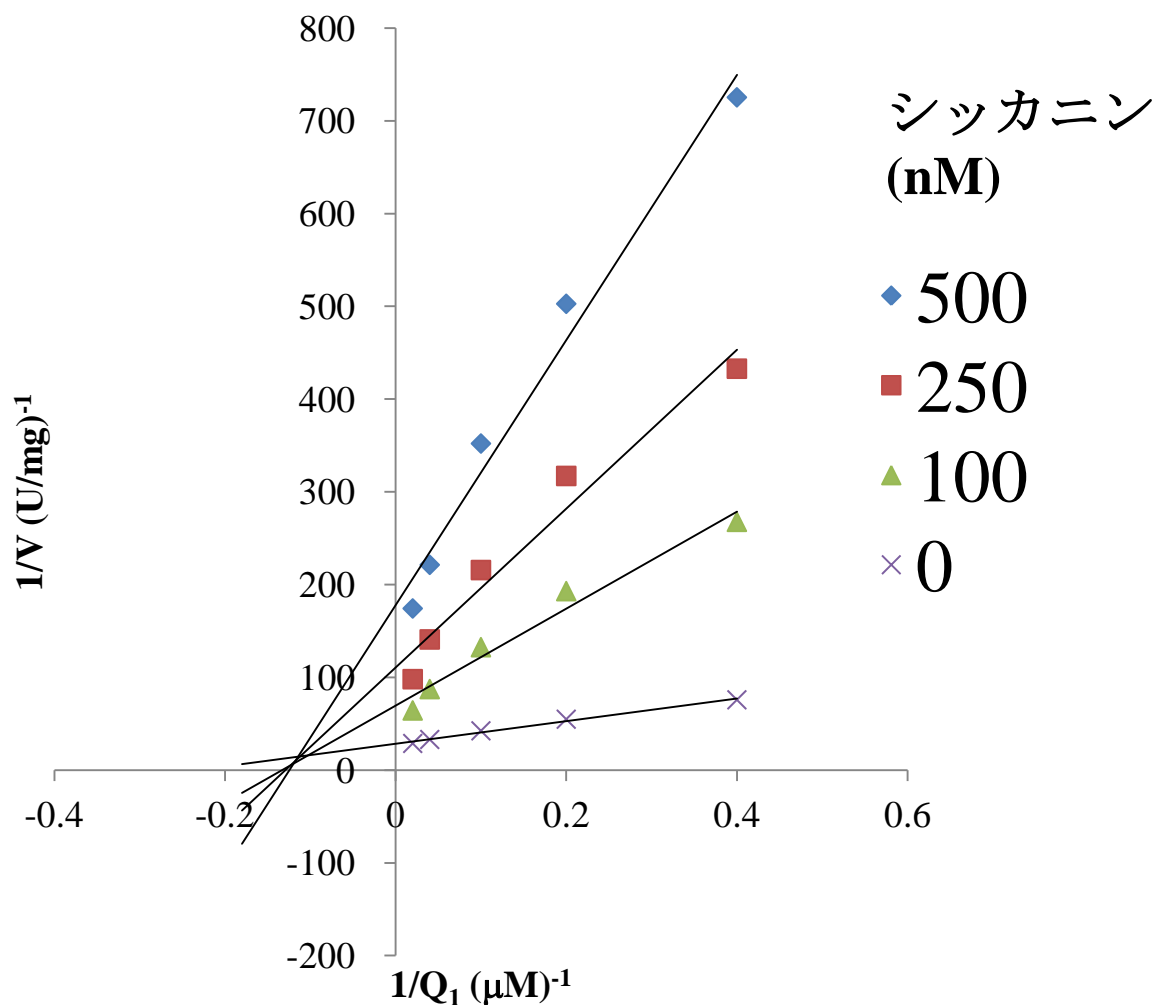
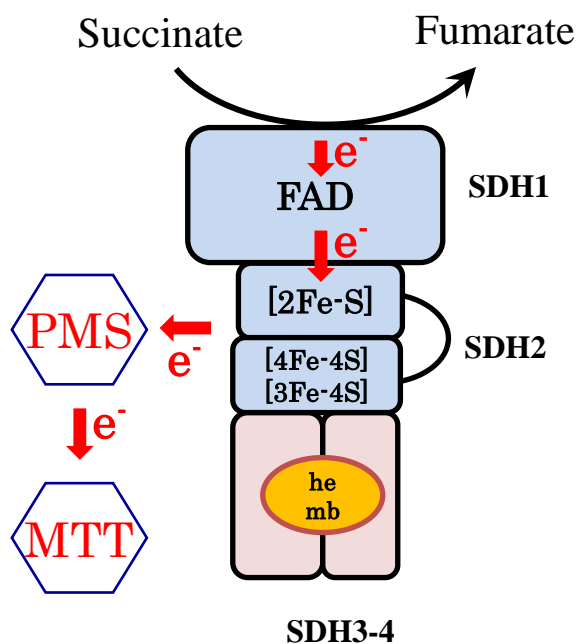


図3-2 ラインウェーバー・バーグプロットによるシッカニンのL-tarantolae SQRに対する阻害機構の解析(UQ₁基質) *L. tarantolae*ミトコンドリアのSQR活性を、4種のシッカニン濃度(0、125、250、500 nM) 下でUQ₁ 濃度を変化させながら96ウェルプレートで測定した。UQ₁ 濃度を横軸、SQR比活性を縦軸に両逆数プロットとして測定値をグラフ化した。ラインウェーバー・バーグプロットで混合阻害を仮定した場合、 K_{i1} と K_{i2} はそれぞれ39 nMおよび102 nMとなった。SQR活性の単位はU= $\mu\text{mol}/\text{min}$ である。

A. SDH活性測定



B. SQR活性測定

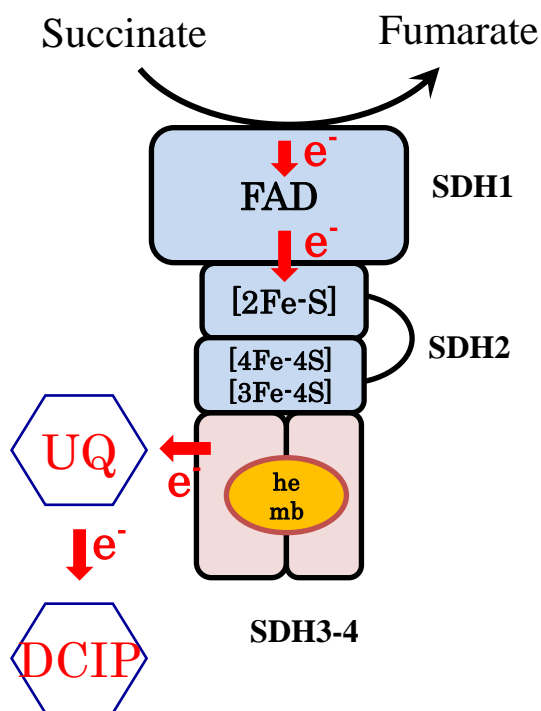


図3-3 (A)SDH活性測定と(B)SQR活性測定 SDH活性測定法において、コハク酸の酸化で得られた電子は、Ipを介して親水性の基質PMSに受け渡される。さらにPMSから電子を伝達されることでMTTが還元され、570 nm波長に吸収が増加する。この還元型MTTの時間あたりの増加量でSDH活性が定義される(A) 。SQR活性測定法において、コハク酸の酸化で得られた電子は、Ip、CybL、CybSを介して疎水性基質デシルユビキノンに受け渡される。さらにデシルユビキノンから電子を伝達されることでDCIPが還元され、600 nm波長の吸収が減少する。この酸化型DCIPの時間あたりの減少量でSQR活性が定義される(B) 。

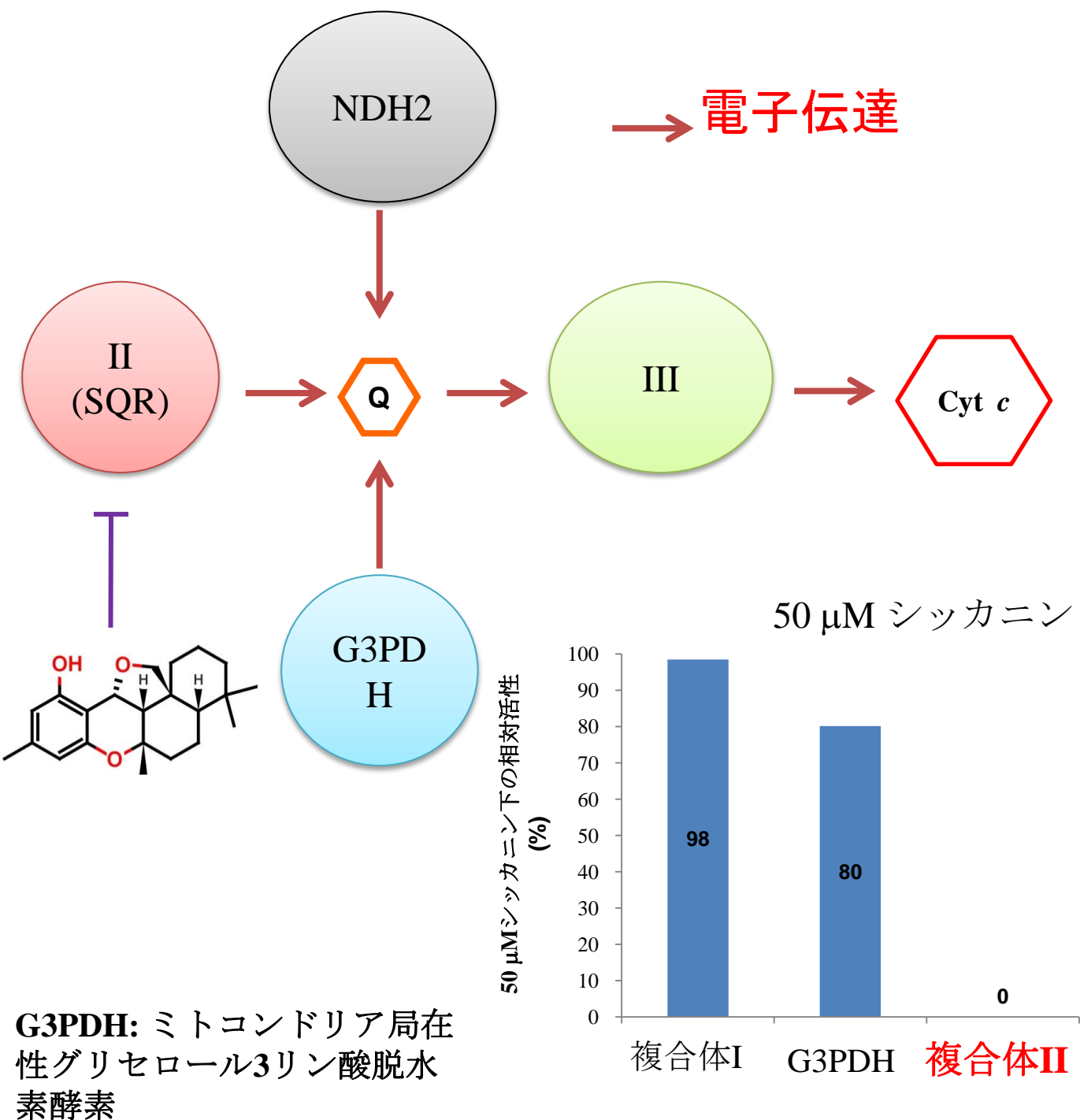


図3-4 シッカニンの標的選択性 *L. tarentolae* ミトコンドリア呼吸鎖複合体I-III, II-III, G3PDH-呼吸鎖複合体III活性を、それぞれ100 μ M NADH、10 mMコハク酸、10 mMグリセロール3リン酸存在下での還元型シトクロムc 増加速度として測定した。活性は1% DMSO添加時を100%とした。

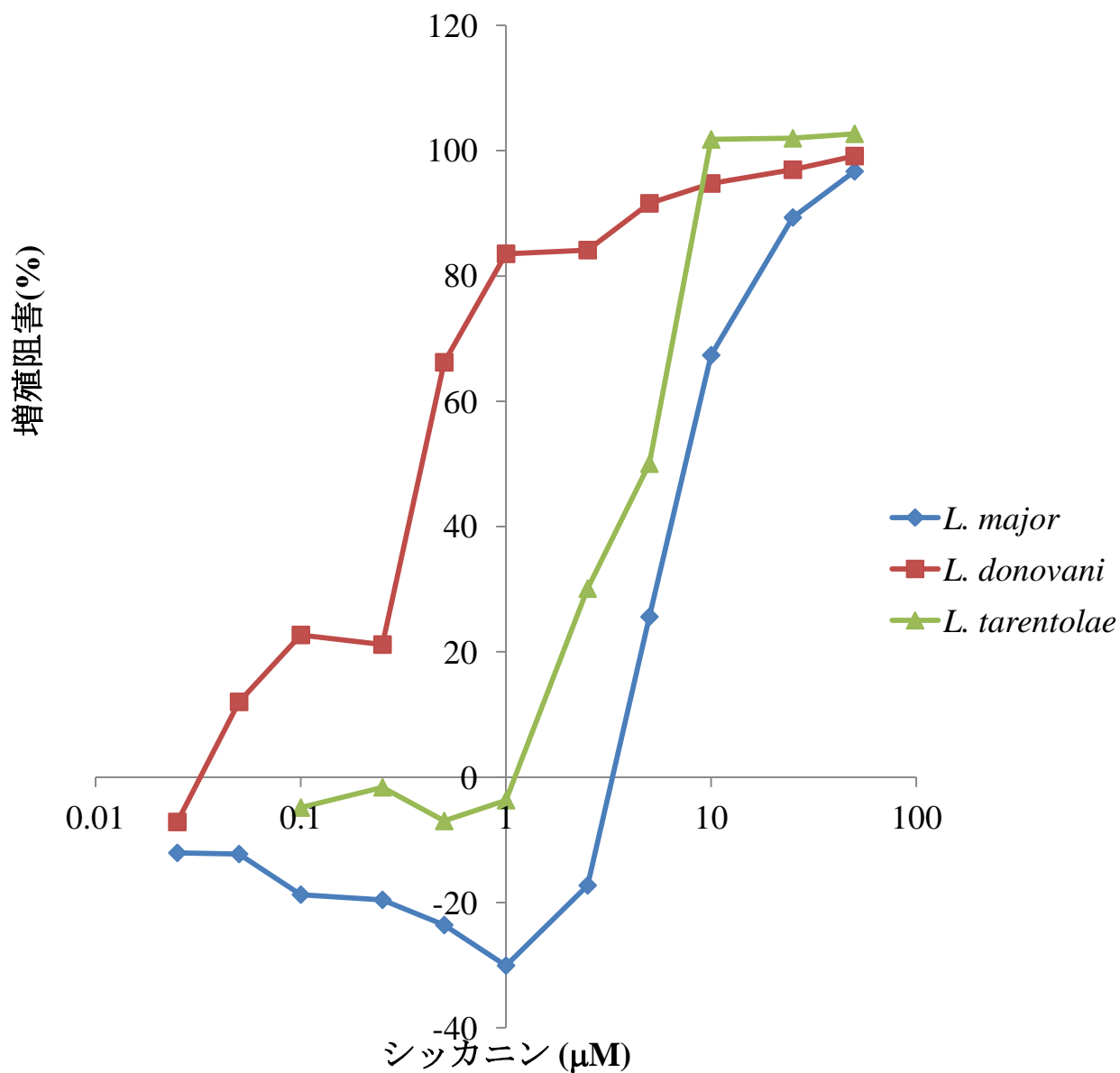


図3-5 リーシュマニア属原虫に対するシッカニンの*in vitro*増殖阻害アッセイ *L. tarentolae* (2×10^6 /ウェル)、*L. donovani* (2×10^5 /ウェル)、*L. major* (2×10^5 /ウェル) をシッカニン存在下でマイクロプレート上において培養した。25 ° C、3日間の培養後、アラマブルーを添加して4時間後に増殖阻害を測定した。1%DMSO添加時を0%阻害として増殖阻害率を算出した。

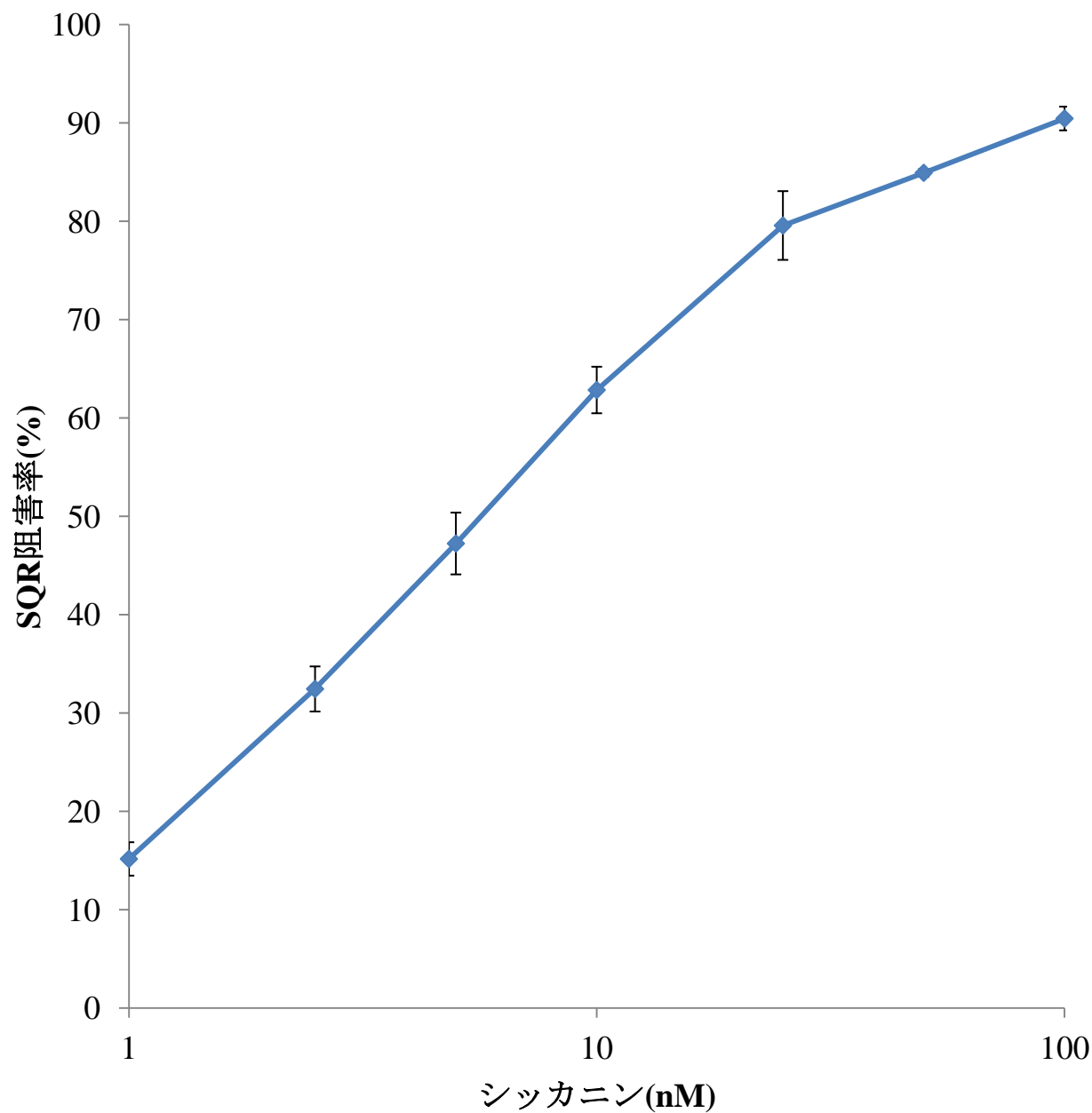


図4-1. *A. suum*呼吸鎖複合体II活性(SQR) に対するシッカニンの阻害効果
*A. suum*精製呼吸鎖複合体IIの酵素活性を測定し、シッカニンの阻害効果を測定した。IC₅₀=5.7±0.5 nMとなった(N=3)。

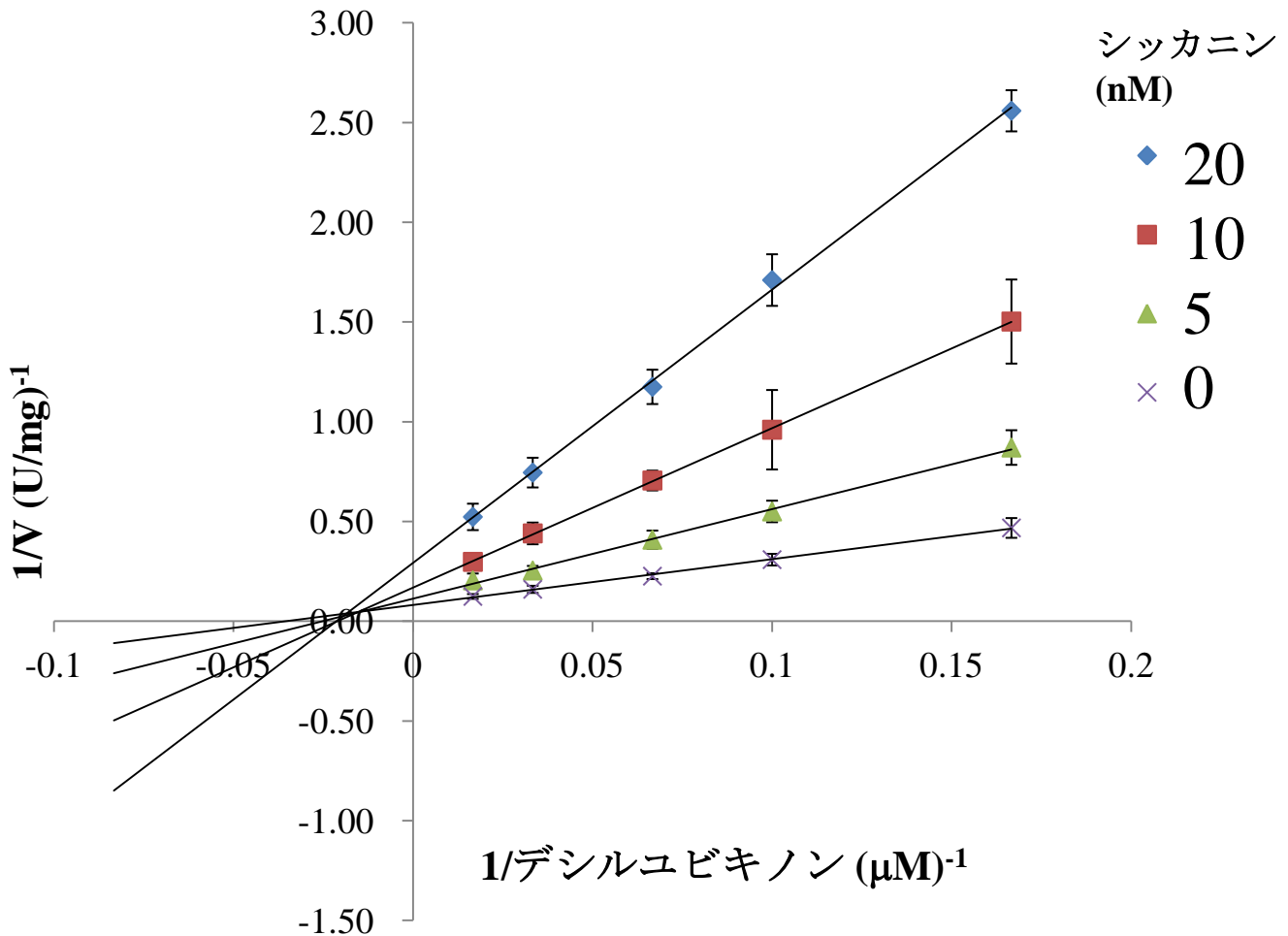


図4-2. ラインウェーバー・バーグプロットによるシッカニンのブタ回虫呼吸鎖複合体II(AsSQR)に対する阻害機構の解析(デシルユビキノン基質) 精製*A. suum*呼吸鎖複合体IIのSQR活性を、4種のシッカニン濃度(0、5、10、20 nM)下でデシルユビキノン濃度を変化させながらキュベットアッセイで測定した(N=3)。デシルユビキノン濃度を横軸、SQR比活性を縦軸に両逆数プロットとして測定値をグラフ化した。ラインウェーバー・バーグプロットで混合阻害を仮定した場合、 K_{i1} と K_{i2} はそれぞれ52 nMおよび36 nMとなった。SQR活性の単位はU= μmol/minである。

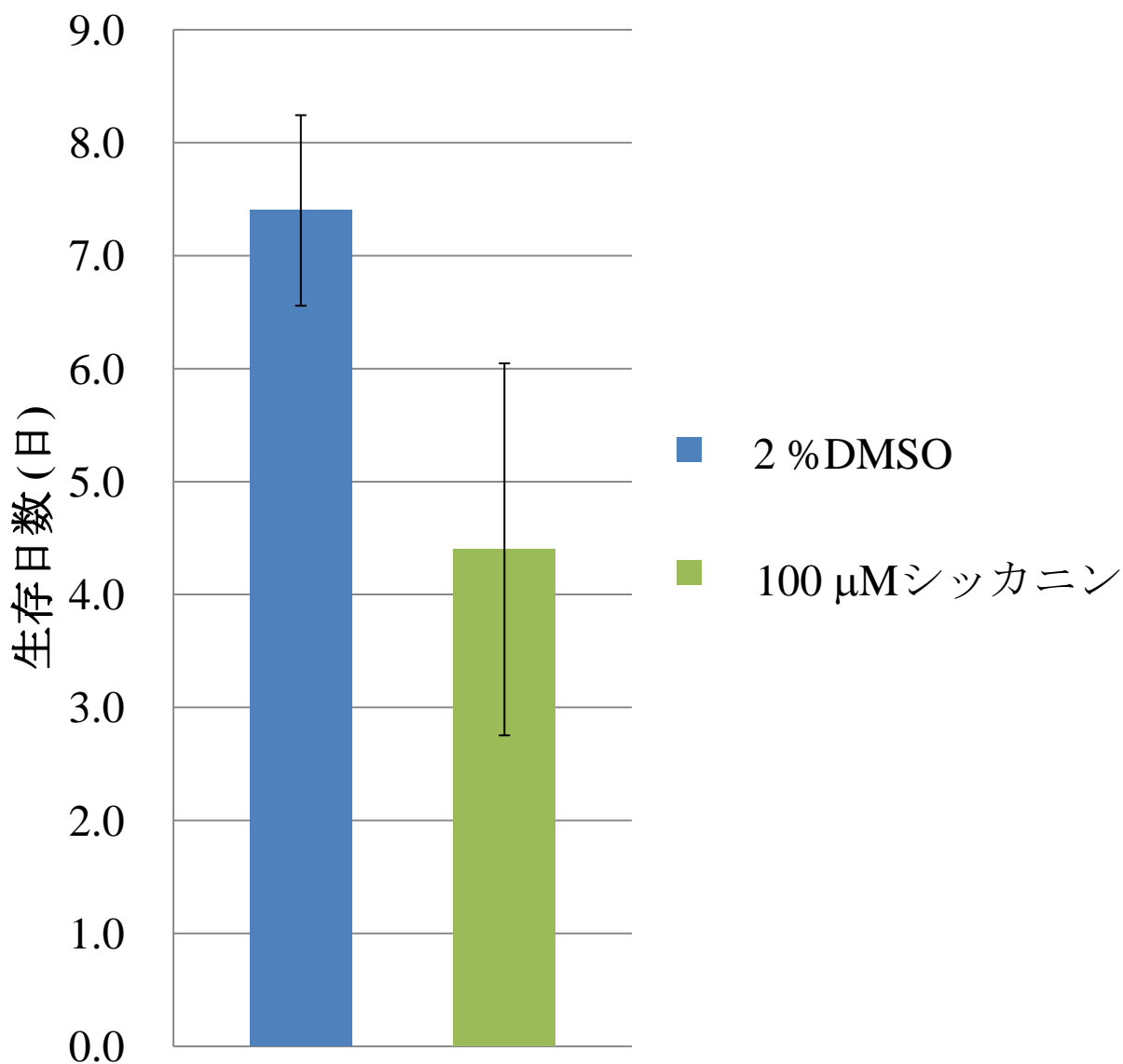


図4-3. シッカニンの成虫*A. suum*虫体への影響 成虫雄*A. suum*を100 μg/mL ペニシリン/ストレプトマイシン入りPBSで洗浄後、内径8-mmのガラス管内で阻害剤を含むRPMI1640培地により培養した。虫体の生死は目視による虫体蠕動運動の有無で判断し、1分間以上の静止が見られた場合に死亡と判断した。観察は一日毎に行い、検体数は10匹とした($p<0.05$)。