

## 論文の内容の要旨

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

### 導入

寄生虫症は発展途上国を中心に大きな被害をもたらしており、WHO を始めとする保険機関が 2012 年に行ったロンドン宣言では、トリパノソーマ症(リーシュマニア症、シャーガス病、アフリカ睡眠病)、土壌伝播蠕虫症、リンパ管フィラリア症と言った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。とりわけトリパノソーマ症に対する化学療法は近年に至っても副作用の強い少数の薬剤に依存しており、薬剤耐性株の出現も報告されていることから、新たな作用機序の新規薬剤の開発が強く望まれている。またトリパノソーマ科原虫の感染地域は、土壌伝播蠕虫症、リンパ管フィラリア症といった寄生性線虫症の分布域とも重複しており、これら複数の寄生虫症に対する共通の有効薬剤の存在は NTDs の化学療法において大きな効果を発揮すると思われる。そこで本研究では、NTDs 寄生虫症の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呼吸鎖複合体 II の阻害剤探索に主眼をおいた広域作用スペクトルの抗寄生虫治療薬開発を目指した。

呼吸鎖複合体 II は酸化リン酸化と TCA 回路を直接結ぶ呼吸鎖複合体唯一の膜局在性タンパク質である。ミトコンドリア内膜に局在し、コハク酸からキノンもしくはキノールからフマル酸への電子伝達を触媒する。ヒトを含む多くの生物において呼吸鎖複合体 II 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) で構成される。呼吸鎖複合体 II は寄生性蠕虫の低酸素の宿主内環境への適応で重要な役割を果たす事が示唆されており、寄生性線虫のモデル生物であるブタ回虫 *Ascaris suum* 成虫は宿主体内の低酸素環境で呼吸鎖複合体 I、複合体 II、低電位のロドキノンからなるフマル酸呼吸系を用いて解糖系で生じる NADH の再酸化を行い、酸素を最終電子受容体としない ATP 合成を行う。この経路が捻転胃虫をはじめとする他の寄生性線虫でも生存に大きく関わりと示唆されることから、線虫呼吸鎖複合体 II は重要な新規薬剤標的の一つとなっている。一方、呼吸鎖複合体 II がトリパノソーマ科原虫の代謝系で果たす役割はわかっていないが、これまでもミルテホシンやタフェモキンといった抗トリパノ

ソーマ症治療薬の一部が原虫呼吸鎖への活性阻害を示すことが報告されてきた。興味深いことに、シャーガス病の病原体である *Trypanosoma cruzi* 由来呼吸鎖複合体複合体 II(TcSQR)は合計で 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 (Morales *et al.*, 2009)。そしてゲノム解析の結果から、TcSQR 全オルソログがアフリカ睡眠病の病原体 *T. brucei*、リーシュマニア症の病原体のリーシュマニア属原虫においても保存されていることが見出された。いくつかの阻害剤に対する感受性も哺乳類由来の複合体 II 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特殊である可能性が示唆された。しかし、原虫特異的なサブユニットが酵素活性に果たす役割は明らかになっていない。またトリパノソーマ呼吸鎖複合体 II に対する選択的阻害剤は発見されておらず、この酵素の阻害剤が新たなトリパノソーマ症治療薬となり得るかを評価した事例は報告されていない。これは病原性トリパノソーマ科原虫の大量培養および原虫呼吸鎖複合体 II の大量調製が困難であり、効率的な阻害剤スクリーニングやミリグラム単位の精製酵素を必要とする酵素の立体構造解析を行えなかったためである。

そこで本研究では培養の容易な非病原性トリパノソーマ科原虫である *Leishmania tarentolae* をモデルとして用い、将来的な原虫複合体 II の立体構造解析を念頭に置いた大量精製法の確立を目指すとともに効率的な阻害剤スクリーニング系の構築を行い、さらに原虫呼吸鎖複合体 II 阻害剤が病原性トリパノソーマ科原虫に与える影響を *in vitro* で評価した。

## 本論

はじめに *L. tarentolae* ミトコンドリアの大量調製、及び *L. tarentolae* 呼吸鎖複合体 II(LtSQR)の小スケール部分精製を行った。*L. tarentolae* を 10L 液体培地で大量培養し、ミトコンドリア画分の調製を行うと、最終的には合計 SQR 活性 340  $\mu\text{mol}/\text{min}$  (U)を含む 2.9 g のミトコンドリアを得た。この活性量は TcSQR 精製時(Morales *et al.*, 2009)における 10L 培養で得られた数値の 14 倍である。さらに *L. tarentolae* ミトコンドリアを中性界面活性剤 SML で可溶化しイオン交換カラム EDM fractogel DEAE で精製を行うと、LtSQR の比活性がミトコンドリア時の約 60 倍に上昇した。得られた精製 LtSQR の収率は可溶化前 LtSQR 活性の 7.1%で、これを繰り返すことで 10L 培養当たりから精製 LtSQR を約 3 mg 得られると考えられる。ここで見出した精製法を用いることで、将来的にはこれまで困難であった X 線結晶構造解析によるトリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II の機能解析が可能になると思われる。

続いて LtSQR のタンパク質レベルにおけるサブユニット構成を解析し、この酵素が病原性トリパノソーマ科原虫の酵素解析におけるモデルとなり得るかを調べた。はじめに可溶化した LtSQR と TcSQR をネイティブ電気泳動すると、両者において SDH 活性染色で 520 kDa 付近にバンドが見られた。さらに精製 LtSQR を用いてネイティブ電気泳動/SDS-PAGE の 2 次元解析を行うと合計で 12 本のバンドが CBB 染色で化学量論的に染色された。これらのバンドへの LC-MS/MS 質量分析によって合計で 9 種の LtSQR サブユニットが同定された。これらの結果は、大量調製が比較的容易な LtSQR が TcSQR と同様、タンパク質レベルでも 12 サブユニット構造を有している事を示している。

これを踏まえ、LtSQR を用いた複合体 II 阻害剤の探索を行った。まず非病原性の *L. tarentolae* とシャーガス病の *T. cruzi*、アフリカ睡眠病の *T. brucei*、リーシュマニア症の *L. donovani*、そして大型哺乳類であるブタのミトコンドリアを用いた呼吸鎖複合体 II 活性測定を行い、マロン酸、カルボキシン、TTFA、アトペニン A5 といった既知の複合体 II 阻害剤に対する酵素の感受性を比較した。すると、アトペニン A5 をはじめとするキノン結合部位阻害剤において全てのトリパノソーマ科原虫が哺乳類に比べて低い感受性を示した一方、コハク酸結合部位に対する阻害剤であるマロン酸では宿主と原虫間で顕著な IC<sub>50</sub> の差は見られなかった。以上の結果は、LtSQR のキノン結合部位構造が病原性トリパノソーマ科原虫酵素と類似している事を示している。そこで、調製の容易な LtSQR を用いてトリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II 阻害剤探索を試み、ここで見出された選択的阻害剤が病原性トリパノソーマ科原虫の酵素を阻害するか否かを調べた。

スクリーニングでは 10 種の呼吸鎖酵素阻害剤について LtSQR に対する阻害活性を測定した。すると、真菌呼吸鎖複合体 II の阻害剤シッカニンにおいて、IC<sub>50</sub> = 190 nM の阻害効果が認められた。同化合物のブタ呼吸鎖複合体 II に対する IC<sub>50</sub> は 861 μM で、選択性は 4500 倍である。シッカニンは LtSQR をキノンに対して混合阻害様式で結合し ( $K_{i1} = 39$  nM、 $K_{i2} = 102$  nM)、呼吸鎖複合体 I、複合体 III、グリセロール 3 リン酸脱水素酵素といった *L. tarentolae* ミトコンドリアのキノン結合酵素は阻害しなかった。このシッカニンは、*T. cruzi*、*T. brucei*、*L. donovani* の複合体 II もそれぞれ 1400 nM、370 nM、1170 nM の IC<sub>50</sub> で阻害した。以上の結果は、LtSQR を用いた本阻害剤スクリーニング系が病原性トリパノソーマ科原虫呼吸鎖複合体 II に対する選択的阻害剤の探索において有用であることを示している。

続いて、今回見出された原虫呼吸鎖複合体 II の選択的阻害剤が原虫症の治療薬となり得るかを調べるため、シッカニンの抗原虫効果を測定した。*T. b. brucei*、*L. donovani*、*L. major*

のシッカニン存在下における培地中での増殖率を *in vitro* でアラマブルー法により測定すると、IC<sub>50</sub>はそれぞれ 8.3、0.7、13  $\mu\text{M}$  となった。*T. cruzi* に関しては、シッカニン存在下でのマウス線維芽細胞内における一細胞あたりの感染原虫数を評価したところ、10  $\mu\text{M}$  のシッカニンで感染細胞中の原虫数が DMSO コントロールの約半分になった。以上の結果は、原虫呼吸鎖複合体 II に対する阻害剤であるシッカニンが実際の虫体に対しても抗原虫効果を示すことを示している。

導入部で述べたとおり、呼吸鎖複合体 II はトリパノソーマ科原虫症と流行地が重複する寄生性線虫症においても重要な薬剤標的の一つである。そしてシッカニンは線虫類のモデル生物である *Caenorhabditis elegans* に対して発達阻害効果を示すという知見が報告されている。そこで、今回見出したシッカニンが抗寄生性線虫症薬剤としても応用可能かを調べるため、モデル生物であるブタ回虫 *A. suum* 呼吸鎖複合体 II に対する阻害効果を測定した。生物医化学教室で精製した *A. suum* 複合体 II を用いて酵素活性測定を行った結果、シッカニンは 5.7 nM という極めて低い IC<sub>50</sub> で阻害効果を示した。哺乳類複合体 II に対する選択性は約 24000 倍で、これまで知られていた複合体 II 阻害剤で最も高い値を示した。しかし、RPMI1600 培地中で成虫ブタ回虫を培養した所、100  $\mu\text{M}$  のシッカニン存在下でも DMSO コントロールと比較して生存日数は大きく変わらなかった。

## まとめと展望

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