

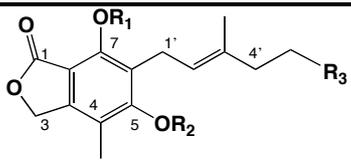
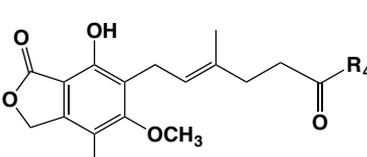
受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 26 年 4 月 11 日

採択番号	25-共同-7		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	五十嵐 慎
研究課題名	ミコフェノール酸をリード化合物とした原虫 IMPDH 特異的阻害剤の研究開発		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	みつはし しんや 三橋 進也	北海道大学大学院農学研究院・特任講師	
研究分担者			
		帯広畜産大学原虫病研究センター・	
研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>原虫感染症は畜産・獣医学領域のみならず、医学領域においても甚大な被害を与えている。根本的な原虫病の撲滅のためには、原虫独特の生活環の解明と、優れた抗原虫薬の開発が求められる。本研究では原虫の<u>イノシンーリン酸脱水素酵素 (IMPDH)</u> の酵素学的性質及び構造が、<u>ヒトのそれと大きく異なる事</u>に着目し、原虫 IMPDH 特異的阻害剤の創製を目的とする。まず、ヒト及びクリプトスポリジウム原虫の組換え IMPDH を調製する。次にヒト IMPDH 阻害剤であるミコフェノール酸 (MPA) の誘導体をデザイン合成し、得られた MPA 誘導体の IMPDH 阻害活性を測定する。それら構造活性相関の結果を、原虫 IMPDH 特異的阻害剤の新規開発に繋げる。</p>		
研究経過の概要	<p>ゲノム情報から核酸生合成経路を推測し、クリプトスポリジウムとタイレリアには IMPDH の代替経路が存在しないと考えられたため、これらの IMPDH をゲノム DNA からクローニングし、GST との組換え融合タンパク質として調製を試みた。しかし、タイレリアは大腸菌での発現を確認できなかった。</p> <p>次に平成 24 年度に合成した化合物 1-7 に加え、助成期間中に化合物 8-17 の合成を完成させた。そこで、これらの化合物の MPA 阻害活性を評価したところ、残念ながら原虫特異的に阻害する MPA はなかった。しかし、トリパノソーマ培養系に添加したところ、化合物 1, 7, 11 に増殖抑制活性が見られた。これらはヒト IMPDH を阻害する化合物であり、なぜ、ヒト培養細胞の存在しないトリパノソーマ培養系で効果を示すかは不明であり、平成 26 年度の申請研究に繋がっていく。また樹皮抽出物や微生物培養抽出物には IMPDH 阻害効果を示すものも見つかかり、平成 26 年度の申請研究にて活性物質の単離を行う。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>研究成果：①クリプトスポリジウム原虫 (<i>Cryptosporidium parvum</i>) の IMPDH 遺伝子を牛の糞便から調製した DNA を用いてクローニングし、GST-CpIMPDH 発現ベクターを作成した。また、ヒト IMPDH を組換えた GST-IMPDH 発現ベクターも作成した。一方、タイレリア原虫 (<i>Theileria parva</i>) の IMPDH も相同性から候補配列を見だし、発現ベクターに組み込んだが大腸菌で発現が確認できなかった。</p> <p>②IMPDH 阻害剤である MPA(化合物 1)とグアノシンーリン酸の、クリプトスポリジウム及びヒトの組換え IMPDH に対する作用を調べたところ、GST 融合タンパク質の状態、既報の値と同様の結果を得た。それぞれの IMPDH 活性の大きさも既報と同様であった。加えて、IMPDH は GST-IMPDH よりも不安定であったことから、GST-IMPDH を活性評価に用いることに結論づけた。</p> <p>③化合物 8-17 の合成を完成させた。</p> <p>④HPLC による生成物定量から、吸光度測定による活性評価系を確立することができた。このことにより多検体の阻害活性評価が現実的に可能となり、図に示した 17 種類の MPA 誘導体について、クリプトスポリジウム IMPDH への阻害活性を測定した結果、ヒト IMPDH に有効な濃度ではいずれも阻害活性を示さなかった。</p> <p>⑤トリパノソーマ培養系に $1 \mu\text{M}$ の濃度で添加し 3 日間培養を行ったところ、化合物 1、7、11 に増殖抑制活性が見られた。$1 \mu\text{M}$ ではクリプトスポリジウム IMPDH は阻害されない濃度であるため、トリパノソーマがヒトと同様の化合物感受性を示す IMPDH を持つ可能性がある。しかし、詳細は不明であるため今後の研究が重要と考えられる。</p> <div style="text-align: right;">  <p> 1: R₁= H, R₂= CH₃, R₃= COOH 2: R₁= H, R₂= H, R₃= COOH 3: R₁= COCH₃, R₂= CH₃, R₃= COOH 4: R₁= CH₃, R₂= CH₃, R₃=COOH 5: R₁= H, R₂= CH₃, R₃= COOCH₃ 6: R₁= H, R₂= CH₃, R₃= CH₂OH 7: R₁= H, R₂= CH₃, R₃= CONHOH 8: R₁= H, R₂= CH₃, R₃= CH₂SCOCH₃ 9: R₁= H, R₂= CH₃, R₃= CH₂SH </p>  <p> 10: R₄= 2-aminopyridine 11: R₄= 3-amino-1,2,4-triazole 12: R₄= 4-amino-1,2,4,-triazole 13: R₄= aminothiazole 14: R₄= aminothiadiazole 15: R₄= aminotetrazole 16: R₄= (7' S)-epoxy 17: R₄= (7' R)-epoxy </p> </div>
<p>研究成果の発表</p>	<p>論文発表 Kazuhiro Sunohara, <u>Shinya Mitsuhashi</u>, Kengo Shigetomi, and Makoto Ubukata: "Discovery of N-(2,3,5-triazoyl)mycophenolic amide and mycophenolic epoxyketone as novel inhibitors of human IMPDH." <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i>, Vol. 23, 5140-5144, 2013</p> <p>学会発表 <u>岡田 只土</u>、<u>三橋 進也</u>、春原 和宏、長岡 愛加、Sarwono Albertus Eka Yudistira、生方 信、<u>五十嵐 慎</u>「ミコフェノール酸誘導体からのクリプトスポリジウム原虫 IMPDH 特異的阻害剤探索」第 83 回日本寄生虫学会大会、一般講演、2014 年 3 月 27 日～3 月 28 日、松山市、プログラム・抄録集 p49</p> <p>下線が報告者、二重下線が原虫病センター所属</p>