

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 27 年 4 月 1 日

採択番号	26 共同-4		
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 准教授
研究課題名	IMPDH を標的とした抗原虫薬の研究開発		
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 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 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。本研究ではクリプトスポリジウム原虫 (<i>Cryptosporidium parvum, Cp</i>) のイノシンーリン酸脱水素酵素 (IMPDH) の酵素学的性質及び構造が、ヒトのものと大きく異なる事に注目し、組換え IMPDH を用いてミコフェノール酸 (MPA) 誘導體や天然物から CpIMPDH 特異的阻害剤を探索する。またトリパノソーマ <i>in vitro</i> 培養系に供することで、MPA 誘導體の抗原虫作用を評価する。また樹皮より抗原虫薬を探索する。</p>		
研究経過の概要	<p>現在、抗原虫薬には特効薬と呼べる薬剤は少ない。その理由として I. 薬剤耐性原虫の出現。 II. 原虫はそれぞれユニークな生活環を有しており、その機構については不明な点が多い、よって標的分子を絞りにくい。 III. 抗原虫薬の優れたスクリーニング系はほとんど確立されていない。 IV. 発展途上国の購買力が小さいため製薬会社が薬剤開発を行わない。などが考えられる。一方、新規抗原虫化合物の作用機序解析は原虫の生理機能解明に繋がる可能性もある。そのため新規化合物は治療薬のみならず研究試薬としての応用も考えられ、アカデミアにおける研究意義は極めて大きい。本研究代表者は昨年度の研究助成金を用いて、組み換え CpIMPDH を調製し、また MPA 誘導體を合成することが出来た。また北海道大学研究林から 8 種の樹皮を取得することも出来た。そこで本年度は五十嵐准教授に加え、井上昇センター長並びに、東大創薬オープンイノベーションセンターとの共同研究で、新規抗原虫剤の開発を開始した。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>【抗トリパノソーマ化合物】トドマツ、カラマツ、シラカンバ、ミズナラ、キハダ、イタヤカエデ、アズキナシ、ハルニレの内樹皮ならびに外樹皮からメタノール抽出物を調製し抗原虫活性を評価した。その結果、トキソプラズマに対してはミズナラ外樹皮が、トリパノソーマに対してはトドマツとシラカンバの外樹皮抽出物が強い活性を示した。次にトドマツから抗トリパノソーマを示した化合物について、単離・構造決定したところ、テルペン類などが同定された。</p> <p>【MPA 誘導体の構造活性相関】IMPDH は IMP と NAD⁺を基質として XMP と NADH を生成する酵素で、核酸生合成経路で重要な役割を担っている。その阻害剤として知られる MPA は、ヒトにおいては臓器移植時に免疫抑制剤として使用される。他方、ほ乳類と原虫の IMPDH アミノ酸配列の相同性は 40% 前後であり、原虫 IMPDH が抗原虫剤の標的となり得るのではないかと考えられてきた。そこで、MPA の誘導体を合成し抗原虫活性を調べ、抗トリパノソーマ活性に重要な構造を見出した。</p> <p>【IMPDH を標的とした HTS】クリプトスポリジウム(<i>Cp</i>)はゲノム DNA の情報等から特に IMPDH への依存度が高いと考えられている。そこで、<i>Cp</i>IMPDH 選択的阻害剤のスクリーニングを目的として評価系の構築を行った。まず組換え GST-<i>Cp</i>IMPDH を大腸菌で発現させ精製し酵素として用いた。検出はプロメガ社製 NAD(P)H 検出發光キットを用いて、ロボット操作可能な評価系の構築を目指した結果、<i>Cp</i>IMPDH 選択的阻害剤の HTS 系を確立することができた。</p> <p>【HTS 化合物ライブラリー】本 HTS 系が認められ、北大薬学供与化合物 1,600 種、既存薬 1,600 種、東大のコアライブラリー 9,600 種の解析を承認された。東大の化合物バンクの総数は約 210,000 種であり、少なくともコアライブラリーの他に更に 10,000 種の化合物を HTS に供することができる。</p> <p>以上のように、新規抗原虫治療薬の創製研究は緒についたばかりではあるが、興味深い結果がみられ始めている。今後、更に注力することで画期的な薬剤の開発も可能であると考えられる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 菅沼 啓輔、三橋 進也、岡田 只士、生方 信、井上 昇「ミコフェノール酸およびその誘導体の抗トリパノソーマ活性評価」第 84 回日本寄生虫学会大会、一般講演、2015 年 3 月 21 日～3 月 22 日、三鷹市、プログラム・抄録集 1D-01 2. Albertus Eka Yudistira Sarwono, Keisuke Suganuma, Shinya Mitsuhashi, Puttik Allamanda, Tadashi Okada, Kengo Shigetomi, Kawazu Shinichiro, Noboru Inoue, and Makoto Ubukata 「Isolation of Trypanocidal Compound(s) from Todomatsu Outer Bark.」日本木材学会北海道支部・平成 26 年度研究発表会、ポスターセッション、2014 年 11 月 12 日、札幌市、日本木材学会北海道支部講演集 p28-29 3. Sarwono Albertus Eka Yudistira, 菅沼 啓輔、三橋 進也、Puttik Allamanda、岡田 只士、重富 顕吾、河津 信一郎、井上 昇、生方 信「Study on todomatsu outer bark as a potential source of trypanocidal compound」平成 26 年度日本農芸化学会北海道支部・東北支部合同支部会、一般講演、2014 年 9 月 22 日～9 月 23 日、札幌市、講演要旨集 p22 4. 菅沼 啓輔、三橋 進也、Puttik Allamanda、Sarwono Yudistira、岡田 只士、重富 顕吾、河津 信一郎、生方 信、井上 昇「ルシフェラーゼを利用した <i>T. congolense</i> HTS 系の確立と道産木材樹皮からの新規抗トリパノソーマ化合物探索」第 157 回日本獣医学会学術集会、一般講演、2014 年 9 月 9 日～9 月 12 日、札幌市、プログラム・抄録集 CO-31