

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-13		
研究部門	創薬研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	抗原虫作用を示す微化研由来天然化合物における分子標的の解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	にへい こういち 二瓶 浩一	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員 研究総括と実験の実施	
研究分担者	いがらし まさゆき 五十嵐 雅之	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・部長 化合物生産菌ブロスおよび化合物ライブラリー資源の開発	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 (役割分担)原虫サンプル調製, 抗原虫活性の検証	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>トキソプラズマは、世界人口の1/3以上が感染していると推定されている。その感染により、流産、新生児の先天性トキソプラズマ症を引き起こし、少子化が進む現代社会において回避できない問題となっている。さらに、畜産業界において、アピコンプレクサ原虫他、原虫感染症による家畜の生産性の低下が国内外で問題視され、経済的損失は大きく、地球規模での被害額は年間約数千億円にのぼるとの試算もある(Reichel et al. <i>Int J Parasitol.</i> 2012)。一方、世界三大感染症のマラリアは、世界で年間3~5億人が罹患し、その内約200万人もの命を奪い、コロナ禍に影響されることなく医学分野で重要な疾患である。我々は、有効な抗原虫薬を開発するために、当研究所で分離した放線菌、糸状菌由来の天然物を中心に化合物のライブラリー化を進めている。その成果として、トキソプラズマ症モデルに対して有効な治癒効果を示す MCF を初め、キジマイシン、スパルソマイシン他、抗マラリア作用を示すアミノペプチダーゼ阻害剤の PBT など原虫薬候補化合物を西川義文教授と共同で発見している。我々は、原虫の小胞体機能および小胞体を含む分泌経路が有効な薬剤標的の一つであることを突き止めている。しかしながら、原虫の分泌経路における小胞輸送の分子レベルでの実体について未だ解っていない点が多い。</p> <p>本申請は、MCF の標的および作用機序を中心に抗原虫活性を示すライブラリー化合物の作用機構を解明することを目的とし、優れた原虫創薬の基盤構築に繋げる。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>原虫病薬は、市場規模が新規薬剤の開発費を下回る。したがって製薬企業がその開発に積極的に着手しないのが現状である。利潤に左右されない大学とわれわれ公的研究機関で抗原虫薬の探索および創薬に向けた開発を実施することが重要である。</p> <p>これまでに、われわれは原虫薬開発に適した天然化合物ライブラリーの構築を行い、トキソプラズマ感染マウスに対する優れた治癒効果を示す MCF を発見した。さらに、MCF は抗ネオスポラ、抗マalaria活性を示すことも確認した。一方、マalaria原虫に高い抗原虫活性を示す PBT を見出した。PBT は、トキソプラズマには、抗原虫活性を示さなかった。MCF の実用化に向けて動物実験による作用機序解析を行う必要がある。その為に MCF の生産量を担保する必要がある、われわれは生産菌による発酵(育種法)で化合物を効率的に得る手法を開発した。われわれは、MCF の原虫に対する有効な作用点の一つが輸送系、ストレス応答に関わる小胞体の機能であることをこれまでに示してきた。しかしながら未だ分子レベルでの証明に至っていない。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>DKP 誘導体の MCF は、トキソプラズマ、ネオスポラおよびマalaria原虫に対する抗原虫活性を示し、MCF がマalariaの既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性を持つ。MCF は、世の中でマalaria既存薬に対する耐性株が出現している現状を踏まえると次世代のマalaria薬として、もしくは、新規アピコンプレクサ門原虫の新規の抗原虫活性を示す薬剤として発展することが期待できる。現存の MCF 生産菌の育種による生産方法では、MCF の原虫に対する作用機序解析、種々の実験動物による感染モデルを用いた解析を進めるのに必要な量を担保するのが困難な状況であった。この現状を打開するために、われわれは、低コストで且つ効率的な MCF の生産方法の開発における基盤構築を行い、育種による生産およびカラム精製で MCF を得ることに成功した。MCF は、経口投与で高い抗原虫作用を示すことを確認している。今後は、MCF の作用する dose, 吸収, 排出について詳細を解析する必要がある、現在、解析を進めている。</p> <p>一方、MCF の抗原虫作用において、これまでにトランスクリプトーム解析から原虫の小胞体および核に作用している可能性を示し、特に、原虫の小胞体におけるストレス応答機構、Sar1GTPase により形成する COPII 小胞、さらに、その小胞輸送経路を経由すると考えられる各エフェクター、アミノペプチダーゼなどの分泌カーゴも標的となる結果が得られた。原虫の小胞体におけるストレス応答機構は、哺乳類や酵母で解っている従来の機構と大きく異なる分子機構と考えられている。さらに、細胞死のメカニズムについても同様に未だわかっていない。したがって、その解明は、新たな分子標的の開発につながり、新たな創薬研究の発展に重要である。</p> <p>本年度は、トキソプラズマの小胞体における COPII 小胞形成に働くと考えられる Sar1GTPase に対するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と予想される因子が Sar1 と同様に MCF の作用部位と考えられたので、その同定を行った。これまで原虫で GEF の存在が明らかにされていなかった。さらに、トキソプラズマ、マalaria原虫など一部のアピコンプレクサ以外の原虫では未だにゲノム上で確認されていない状況である。酵母、哺乳類などの Sar1GEF で保存される Sec7ドメイン、WD リピートドメイン、II 型膜タンパク質のトポロジーを考慮し、トキソプラズマ Sar1GEF を酵母変異株を用いて機能相補する因子を同定した。さらに、その特異的抗体を調製し、トキソプラズマ動物培養細胞感染モデル系のライセートにおいて、キソプラズマ Sar1GEF が発現していることを確認した。従って、原虫において実際に Sar1GEF が働いている可能性が示された。</p> <p>現在、酵母変異株を相補するトキソプラズマ Sar1GEF 発現系を用いて触媒機能に必要な最小部位、小胞体局在化シグナルについて解析中である。</p>

<p>研究成果の 発 表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leessombun A, Iijima M, Umeda K, Kondoh D, Pagmadulam B, Abdou AM, Suzuki Y, Ohba SI, Isshiki K, Kimura T, Kubota Y, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis. <i>J Infect Dis.</i> 221 (5).pp764-776. doi: 10.1093/infdis/jiz501. 2020. 2. Leesombun A, Iijima M, Pagmadulam B, Orkhon B, Doi H, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin has potent anti-malarial activity. <i>Parasitol Int.</i> 2021 81, 102267. doi:10.1016/parint.2020.102267. 2021. 3. <u>Nihei C</u>, Nakanishi M. Cargo selection in the early secretory pathway of African trypanosomes. <i>Parasitol Int.</i> 84, 102379. doi: 10.1016/j.parint.2021.102379. 2021. 4. Leesombun A, Kondoh D, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Polyether ionophore kijimicin inhibits growth of <i>Toxoplasma gondii</i> and controls acute toxoplasmosis in mice. <i>Parasitol Res.</i> doi: 10.1007/s00436-021-07363-w. 2021. 5. Ariefta NR, Pagmadulam B, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Sparsomycin Exhibits Potent Antiplasmodial Activity In Vitro and In Vivo. <i>Pharmaceutics.</i> 14(3):544. doi: 10.3390/pharmaceutics14030544. 2022.
----------------------	--