

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

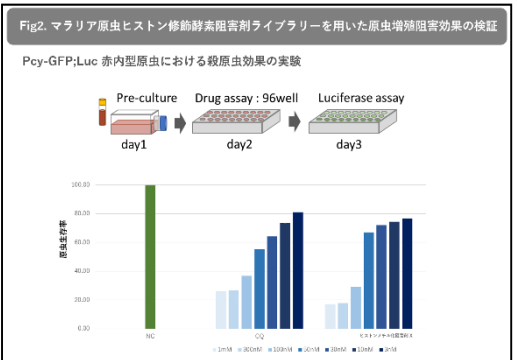
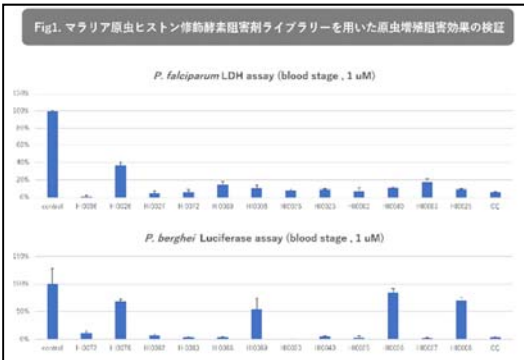
2023年5月30日

採択番号	2022-共同-3		
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	河津 信一郎
研究課題名	ヒストン制御機構に着目した新規抗マalaria化合物のスクリーニングと原虫オルガネラの三次元構造解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	あらか たまさ 荒木 球沙	国立感染症研究所 寄生動物部・任期付研究員	
研究分担者	あんのうら たけし 案浦 健	国立感染症研究所 寄生動物部・室長	
	かわい さとる 川合 覚	獨協医科大学 熱帯病寄生虫病学・教授	
	かわず しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>本研究では、新規抗マalaria化合物のスクリーニングのためにヒストン制御機構に着目し、原虫の肝内型ステージの休眠期と増殖期におけるメカニズムの解明と、それらを用いた際の原虫オルガネラの三次元構造解析を実施する。申請者らが既に作製に成功した可視化サルマalaria原虫 <i>Plasmodium cynomolgi</i> (Pcy-GFP;Luc)株と可視化ネズミマalaria原虫 <i>P.berghei</i> (Pb-GFP;Luc)株を使用し、培養肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 感染実験系によりルシフェラーゼアッセイを用いた薬物感受性試験を行う。また、化合物における原虫の増殖機構への影響を詳細に評価するために、集束イオンビーム内蔵の走査型電子顕微鏡(FIB-SEM)を使用し、化合物環境下の原虫オルガネラの三次元構造解析を試みる。</p>		
研究経過の概要	<p>新型コロナウイルス感染症の影響で実験用アカゲザルの搬入が遅れ、当初の予定より実験の進行が遅れた。2023年3月現在アカゲザルへの感染実験を遂行中であり、肝内型原虫における化合物ライブラリーを用いたスクリーニング実験を随時実施する予定である。そのため、本年度は関連実験として <i>in vitro</i> 培養系で維持が可能な <i>P.berghei</i>と <i>P.falciparum</i>を用いた赤内型におけるスクリーニング実験を実施した。実験に使用したライブラリーは、セレックバイオテック社より選定したで原虫ヒストン修飾酵素阻害化合物全200種類である。結果、<i>P.falciparum</i>では、200化合物中34化合物で既存の薬と同程度または、それ以上の効果を示すものが明らかとなった。また、<i>P.falciparum</i>において非常に原虫阻害効果の高かった化合物13種類を用いて <i>P.berghei</i>への増殖阻害効果を確認したところ、驚いたことに原虫阻害効果が殆どない化合物も認められた(Fig1)。本実験により、原虫種によって各々のヒストン修飾酵素は、異なる働きを持つことが示唆された。</p>		

研究成果の概要

更に我々は、*P. cynomolgi* に関しても赤内型におけるスクリーニング実験に向けた *in vitro* 培養系を構築した。これまで、*P. cynomolgi* (B株)においては、赤内型の *in vitro* 培養系が存在せず、薬剤スクリーニング実験の実施が非常に困難であった。そこで、今回我々の作製した luciferase 発現株 Pcy-GFP;Luc 株を使用して構築した短時間培養系から、*P. cynomolgi* の薬剤感受性の実験の樹立に成功した。原虫の増殖の阻害効果の指標には、luciferase signal を用いて、luciferase assay による測定を行った。この実験系から本実験では、既存の抗マalaria薬である CQ (chloroquine) とヒストンメチル化酵素阻害剤 X を用いて *P. cynomolgi* の原虫増殖阻害効果を確認した。結果、CQ においてもヒストンメチル化酵素阻害剤 X においても非常に低濃度で原虫を殺滅することが明らかとなった。

また、肝内型原虫においても *P. berghei* を使用して同阻害化合物ライブラリーを用いたスクリーニング実験を開始しており、非常に興味深いデータを得ている。*P. cynomolgi* に関しても、スポロゾイトの調整が完了次第随時、肝内型原虫における本ライブラリーを用いたスクリーニング実験を開始する予定である。今後、本研究の遂行により、休眠期原虫の再活性化機序の分子トリガーが明らかとなれば、殺原虫活性を有する新たな化合物スクリーニングを実地できる可能性があり、マリアの創薬科学に大きく貢献することが出来る。



研究成果の発表

- 学会発表**
1. 荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、梅木優子、立石祐樹、中野由美子、岡本宗裕、保富康宏、久枝一、案浦健「可視化マalaria原虫を用いた休眠・増殖の分子機構と創薬基盤の構築」帯広畜産大学原虫病研究センター2022 年度共同研究報告会(帯広:2023 年 3 月)
 2. 荒木球沙、川合覚、梅木優子、立石祐樹、中野由美子、岡本宗裕、保富康宏、久枝一、案浦健「マalaria原虫・肝臓内休眠体ステージの解析を目的とした可視化原虫株の開発(1)～可視化原虫株の作製、全発育期における確認、*in vitro* 解析、創薬開発への発展性～」第 92 回日本寄生虫学会大会(金沢:2023 年 3 月)
 3. 荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡を用いたマalaria原虫オルガネラの三次元構造解析」第 28 回分子寄生虫ワークショップ/第 18 回分子寄生虫マalaria研究フォーラム合同大会