

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024 年 5 月 21 日

採択番号	2023-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	2023 年 4 月 1 日 ～ 2024 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	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。 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。		

研究経過の概要	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。 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、抗マラリア活性を示すことも確認した。一方、マラリア原虫に高い抗原虫活性を示す M1 アミノペプチダーゼ阻害剤 PBT を見出した。PBT は、MCF 同様にペプチド由来の天然化合物である。 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。
研究成果の概要	PBT は、トキソプラズマに対して有効な抗原虫活性を示さなかった。さらに、PBT は重症化マラリア感染モデルに対して有効な抗原虫作用を示した。従って、PBT は、マラリア原虫のアミノペプチダーゼにより特異的に作用することが考えられ、今後の抗マラリア薬のリード化合物候補として期待が持てる(Ariefta NR et al. AAC. 2023)。 世の中でマラリア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、MCF だけでなく PBT も次世代の新規マラリア薬の発展に繋がることが期待できる。 抗原虫剤 MCF の抗原虫作用において、これまでに我々の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。 本年度は、トキソプラズマ原虫の小胞体、ゴルジ体周辺オルガネラを可視化し、MCF の作用点を突き止めるために各々の局在マーカー抗体を調製し、間接蛍光抗体法で共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。 MCF の原虫に対する作用点を考える上で、重要な Sar1GTPase に対するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の小胞体局在化シグナル KDEL を認識するレセプターと考えられる Erd2 ホモログ2種類に対する抗体、小胞体シャペロン BiP, PDI, その他、HSP70, 90 の抗体を調製し観察に用いた。その結果、Sar1GEF が一方の Erd2 と共局在することが明らかとなった。その局在性は、核周りに存在するトキソプラズマの小胞体のパターンと言うよりドット状のパターンを示した。おそらく、ゴルジ体に近い部位もしくはゴルジ体に局在する可能性が示された。現在、ゴルジ体マーカーに対する抗体を調製し、さらに解析を進める予定である。

研究成果の 発 表	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. 6. Ariefta NR, Pagmadulam B, Hatano M, Ikeda N, Issiki K, Matoba K, Igarashi M, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Antiplasmodial Activity Evaluations of a Bestatin-related Aminopeptidase Inhibitor, Phebestin. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy.</i> 67 (7):1-14. 2023.
----------------------	--