帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月28日

採択番号	2024 共同-11		
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	抗アピコンプレキサ剤の分子標的における <i>in vitro</i> 再構成系および創薬基盤の創世		
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 化合物生産菌プ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	2024年4月1日 ~ 2025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、アピコンプレキサ原虫他、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、トキソプラズマおよびマラリアモデルに対して有効な治癒効果を示す MCF を初めとする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、MCF の作用機序解析から原虫の小胞体を含む分泌経路が有効な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>本研究は、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>		
研究経過の概要	<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</p>		

	<p>チド由来の天然化合物である. 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が, 重症化マalaria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alaria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alaria薬のリード化合物候補として期待が持てる (Arieftha NR et al. AAC. 2023).</p> <p>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>抗原虫剤 MCF の抗原虫作用において, われわれのトランスクリプトーム解析から原虫の小胞体含む分泌経路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. しかし, 原虫で Sar1GTPase を活性化するシステムの実体が未だ分かっていないのが現状でもあった. 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>われわれは, 昨年度までに MCF 作用点と考えられる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共焦点顕微鏡によるマーカー分子の間接蛍光抗体法で可視化した原虫以外の生物で既知の Sar1 の活性化に働く Sar1GEF の配列を基にトキソプラズマゲノム DB から探索したところ, Sec7, WD, 膜貫通ドメインを持つ因子を 1 コピー存在することを見出した. その Sar1GEF 様の因子は, トキソプラズマ以外にネオスポラ, クリプトスポリデウムなど一部のアピコンプレクサ門原虫のみに保存されていた. その配列上の特徴として, 内腔側の C 末端に小胞体残留モチーフ KDEL 配列を持ち, 配列全体の中で Cys 残基に富んでおり, 細胞質側可溶性ドメインの膜貫通ドメイン TMD の直前に Cys リピートドメインを持ち, TMD 内にも存在する. さらに, トキソプラズマ Sar1GEF は, Sar1GTPase と同様, MCF の作用標的であることが分かってきた. この Sar1GEF に対する抗体を作製し, 細胞内局在解析を行った. トキソプラズマにおいて, KDEL レセプターの Erd2 が2コピー存在し, 一方とドット状の共局在性を示すことを確認した. これらの結果は, Sar1GEF の KDEL が小胞体およびゴルジ体間の局在またはソーティングに機能的働くことを示唆する結果でもあった.</p> <p>本年度は, その結果を踏まえ原虫の小胞体の pre-budding complex 形成を触媒する Sar1GTPase と Sar1GEF との間の生体内の素反応の再構成系の構築を行った. Sar1GTPase のドメイン構造と機能性を確認するために酵母変異株を用いた相補性試験を行った. その結果, 宿主側の Sar1GEF と異なり, トキソプラズマ由来は, Cys リピートドメインが生理的に重要であることを確認した. さらに, 酵母内では, KDEL シグナルに依存せずに機能性を示すことを確認した. トキソプラズマ Sar1GEF のアミノ酸配列の特徴から大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の調製が困難と判断し, コムギ胚を利用する <i>in vitro</i> 翻訳システムを用いて系の構築を進めた. 一方, Sar1 は双方の系で発現と精製を行った. その結果, タンパク質は発現したものの, 発現量が少なく, 精製に至らなかった. 今後は, 系のスケールアップを実施し, 精製因子を得る予定である. Sar1 と Sar1GEF との複合体形成を確認する為に, AlphaFold3, MCF と複合体との結合を Bolz_on_Colab.を用いて立体構造の計算予測解析を行った. その結果, Sar1GEF は基質となる Sar1GDP と複合体形成することを確認した. 原虫由来の複合体形成は, 既存の Sar1GEF の K ループに依存した Sar1 への結合とは異なる様式であることが明らか</p>

	かとなった。さらに、MCF が宿主由来 SarGEF には存在しない C399 含む Cys リポドメインとその立体的近傍の R242 と 345, C309 に架橋されていた。この結果は、MCF の宿主に毒性を示さずに原虫特異的に活性を示す要因の1つと考えられた。
研究成果の 発 表	<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. 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. 7. Chen Y, Shimoda N, <u>Nihei C</u>, Sawa R, Nishigori M, Nakamura M, Koshiba T, Ushio N, Nishikawa Y. Mitochondrial damage and IL-18 production of monocytes by <i>Neospora caninum</i> infection is mediated by dense granule protein 7 and prohibitins. <i>Frontiers in Immunology.</i> 2024. <i>in revision.</i>