

称号及び氏名	博士（応用生命科学）	別所 知明
学位授与の日付	平成25年3月31日	
論文名	Identification and Characterization of a Novel Drug Target of Ribavirin against African Trypanosomiasis (アフリカトリパノソーマ症におけるリバビリンの新規薬剤標的分子の同定および機能解析)	
論文審査委員	主査 乾 隆	
	副査 太田 大策	
	副査 杉本 憲治	

論文要旨

序論

アフリカトリパノソーマ症は寄生性原虫 *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) によって引き起こされる人獣共通感染症である。本症に感染すると血液内で *T. brucei* が増殖し、感染末期には脳に到達した *T. brucei* によって髄膜脳炎が引き起こされるため、治療しなければ必ず死亡する重篤な病である。本症にはいくつかの治療薬が存在するが、薬剤の副作用、及び薬剤耐性原虫の出現などが報告されており、新規治療薬の開発が望まれている。

Ribavirin は抗ウイルス作用、及び抗腫瘍作用を有する化合物であり、日本ではC型肝炎の治療薬として用いられている。Ribavirin は生体内でリン酸化され、活性型である ribavirin 5'-monophosphate (RMP) となり、inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) を阻害することが報告されている。

IMPDH は、NAD を補酵素として inosine 5'-monophosphate (IMP) から xanthosine 5'-monophosphate (XMP) への酸化反応を触媒する酵素であり、生体内において細胞増殖、細胞分化、及び DNA (RNA) 合成などをコントロールする役割を担っている。従って、本酵素は抗癌剤、抗ウイルス剤の標的分子として注目されている。

Guanosine 5'-monophosphate reductase (GMPR) は、NADPH を補酵素として guanosine 5'-monophosphate (GMP) から IMP への還元反応を触媒する酵素であり、体温の恒常性維持に重要な働きを担っている。また、本酵素を標的とした抗癌剤、及び抗リーシュマニア症治療薬の開発研究が行われている。近年、RMP が大腸菌由来 GMPR を阻害するという研究成果が報告されている。

本研究の目的は、アフリカトリパノソーマ症に対して薬効を示す化合物を同定するとともに、その標的分子を同定することである。私は、*T. brucei* 感染ラットを用いた化合物評価を行い、ribavirin が抗トリパノソーマ作用を有することを明らかにした。また、ribavirin の標的分子を同定するために、*T. brucei* 由来 IMPDH (TbIMPDH)、及び GMPR (TbGMPR) の組換え酵素を精製し、酵素化学的機能解析を行うとともに、両酵素に対する RMP の阻害効果を検証した。

第1章 アフリカトリパノソーマ症に対する ribavirin の *in vivo* 薬理評価

血中原虫濃度が 1.0×10^6 cells/ml に達した *T. brucei* 感染ラットに 200 mg/kg ribavirin を 5 日間経口投与し、投与開始からの生存期間、血中原虫濃度、及び体重変化を測定した。PBS 投与群の平均生存期間は 1.25 日であり、ribavirin 投与群の平均生存期間は 11.3 日であった。PBS 投与群は投与開始から 3 日間でエンドポイント (1.0×10^8 cells/ml) まで血中原虫濃度が上昇した。一方、ribavirin 投与群は投与 2 日後には血中原虫濃度が検出限界以下 (1.0×10^5 cells/ml) まで減少し、投薬終了後、継時的に原虫が増殖した。一方、5 日間の ribavirin 経口投与によって約 5% の体重減少が観測された。

第2章 *Trypanosoma brucei* 由来 inosine 5'-monophosphate dehydrogenase の機能解析

組換え型 TbIMPDH は、GST 融合蛋白質として大腸菌 BL21 (DE3) で大量発現させ、各種クロマトグラフィーを用いて精製した。基質 IMP、及び補酵素 NAD を用いて、本酵素の反応生成物が XMP、及び NADH であることを HPLC 分析により確認した。ゲル濾過クロマトグラフィーを行った結果、TbIMPDH の多量体の分子量は約 420 kDa であった。超遠心分析を行った結果、TbIMPDH の沈降係数、及び分子量はそれぞれ 14.5 S、及び 389 kDa であった。TbIMPDH の単量体の分子量が 57 kDa であることから、TbIMPDH は 7 量体を形成することが示された。これまでに研究されている IMPDH はすべて 4 量体を示すことから TbIMPDH は特徴的な多量体構造を形成していることが明らかになった。TbIMPDH の酵素化学的性質を調べた結果、TbIMPDH は pH 8.5、35 °C において最大活性を示すことが明らかになった。また、pH 8.5 以上において pH 依存的な

TbIMPDH 活性の減少が観測された。円偏光二色性測定を行った結果、pH 8.5 以上において pH 依存的な近紫外 UV スペクトルの変化が観測された。従って、高 pH 条件下における酵素活性の減少は TbIMPDH の側鎖の構造変化に起因するアルカリ変性によって惹起されることが示唆された。反応速度論的解析の結果、TbIMPDH は IMP に対してミカエリスメンテン型の反応曲線を示し、NAD に対して基質阻害を示した。また、得られた反応速度パラメーターは $k_{\text{cat}} = 0.28 \text{ sec}^{-1}$, $K_{\text{m IMP}} = 30 \text{ }\mu\text{M}$, 及び $K_{\text{m NAD}} = 1300 \text{ }\mu\text{M}$ となり、NAD に対する基質阻害定数は $K_{\text{ii NAD}} = 3.0 \text{ mM}$ であった。TbIMPDH の阻害実験を行った結果、RMP, mycophenolic acid, 及び mizoribine monophosphate に対する TbIMPDH の阻害定数はそれぞれ $3.2 \text{ }\mu\text{M}$, 21 nM , 及び 3.3 nM であった。

TbIMPDH が 7 量体を形成すること、及び TbIMPDH の NAD に対する基質親和性がヒト由来 IMPDH type2 の NAD に対する基質親和性と大きく異なることから、TbIMPDH が 7 量体を形成するため、NAD に対する結合様式がヒト由来 IMPDH の結合様式と異なっている可能性がある。従って、TbIMPDH は宿主由来 IMPDH とは異なる性質を有しており、アフリカトリパノソーマ症の薬剤標的分子となる可能性を見出した。

第 3 章 *Trypanosoma brucei* 由来 guanosine 5'-monophosphate reductase の同定、及び機能解析

TbGMPR 遺伝子はゲノムデータベース上に登録されていなかったため、TbGMPR 遺伝子の探索を行った。ヒト由来 GMPR type2 の遺伝子配列をクエリとして、BLAST 検索を行った結果、6 個の候補配列を得た。次に候補遺伝子の中で bit スコアが高く、E-value の値が低い Tb927.5.2080 遺伝子の解析を行った。RT-PCR 解析の結果、本遺伝子に対応するバンドが観測され、*T. brucei* において本遺伝子が mRNA として存在することが明らかとなった。次に Tb927.5.2080 遺伝子のクローニング、及びその組み換え蛋白質の精製を行った。組換え蛋白質は GST 融合蛋白質として大腸菌 BL21 (DE3) で大量発現させ、各種クロマトグラフィーを用いて精製した。基質 GMP, 及び補酵素 NADPH を用いて組換え蛋白質の反応産物を HPLC 分析した結果、反応時間の経過に伴い GMP の減少、及び IMP の増加が観測された。以上の結果から、本組換え蛋白質が GMPR 活性を有する酵素であることが示され、本研究によって世界で初めて *T. brucei* が GMPR を有することを証明した。

TbGMPR 遺伝子の解析を行った結果、TbGMPR とヒト由来 GMPR type1, 及び TbGMPR とヒト由来 GMPR type2 のアミノ酸配列の相同性はそれぞれ 36%, 及び 37% であった。各生物種由来 GMPR のアミノ酸配列をアライメントした結果、触媒残基であるシステインは保存されており、ヒト由来 GMPR type2 におい

て GMP と相互作用している残基も良く保存されていた。興味深いことに、*Trypanosoma* 目に属する生物種由来 GMPR には他の GMPR には存在しない配列が存在した。PROSITE を用いたドメイン検索の結果、本配列はタンデムな cystathionine β -synthase ドメインであることが明らかになった。

次に TbGMPR の酵素化学的性質について調べた。一価の塩による活性の影響について調べた結果、NaCl 添加時と比較すると KCl, NH₄Cl の添加によって TbGMPR の活性が有意に上昇することが明らかとなった。TbGMPR の反応速度論的解析を行った結果、TbGMPR の反応速度パラメーターは $k_{cat} = 0.5 \text{ sec}^{-1}$, $K_{m \text{ GMP}} = 89 \text{ }\mu\text{M}$, 及び $K_{m \text{ NADPH}} = 12 \text{ }\mu\text{M}$ であった。RMP を用いて酵素阻害を調べた結果、RMP の濃度依存的に TbGMPR の活性が阻害され、 $IC_{50} = 105 \text{ }\mu\text{M}$ であった。一方、1.0 mM RMP 存在下において宿主であるウシ由来 GMPR type1 の活性は阻害されず、ウシ由来 GMPR type2 の活性は約 20% 阻害された。RMP の阻害様式を調べたところ、RMP は TbGMPR に対して競合阻害を示し、阻害定数は $K_i = 7.6 \text{ }\mu\text{M}$ であった。従って、RMP は *T. brucei* 特異的に GMPR を阻害することが明らかになった。

結論

Ribavirin の経口投与によって *T. brucei* 感染ラットの生存期間が有意に延長したことから、ribavirin が抗トリパノソーマ活性を有する化合物であることが明らかになった。Ribavirin は生体内でリン酸化されて RMP となる。RMP は TbIMPDH, 及び TbGMPR の活性を阻害した。また、RMP が TbGMPR 特異的に酵素活性を阻害することが明らかになった。従って、TbGMPR を特異的に阻害する RMP 類縁体のヌクレオシドが高い抗トリパノソーマ活性を有する薬剤である可能性が示された。

審査結果の要旨

African Trypanosomiasis (アフリカトリパノソーマ症) は、neglected tropical disease (顧みられない熱帯病) のひとつであり、ツェツェバエが媒介する寄生性原虫 *Trypanosoma* によって引き起こされ、中央アフリカなどの熱帯地域を中心に蔓延している人獣共通感染症である。本症が進行すると睡眠周期が乱れ、最終的には昏睡して死に至る。現在用いられている本症の治療薬は副作用が強く、且つ薬剤耐性原虫も出現していることから、新規治療薬の開発が強く望まれている。

Trypanosoma brucei (*T. brucei*) は、プリン核酸生合成を担う酵素群が欠如しているため、外因性のプリン塩基およびヌクレオシドを修飾することにより生育に必要な核酸分子を合成する。従って、*T. brucei* のプリン核酸合成酵素は、良い薬剤標的であると考えられている。Ribavirin は、抗ウイルス作用および抗腫瘍作用を有する化合物であり、日本ではC型肝炎の治療薬として用いられている。これまでに ribavirin は、生体内でリン酸化され、活性型である ribavirin 5'-monophosphate (RMP) となり、inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) を阻害することが報告されている。IMPDH は、グアニンヌクレオチド合成の律速段階の反応である IMP から xanthosine 5'-monophosphate (XMP) への酸化反応を触媒する酵素であり、細胞増殖をはじめとした様々な生体機能に関与しているため、抗微生物、抗ウイルス、免疫抑制および抗癌治療の薬剤標的として注目されている。一方、guanosine 5'-monophosphate reductase (GMPR) は、NADPH 依存的に GMP から IMP への脱アミノ化反応を触媒する酵素であり、生体内の核酸濃度を制御する働きを担っている。

本申請論文では、本症の新規薬剤候補分子として ribavirin を見出し、*T. brucei* 感染ラットに対する ribavirin の薬効評価を行うとともに、ribavirin の薬剤標的分子を同定するために、*T. brucei* 由来 IMPDH (TbIMPDH) および GMPR (TbGMPR) の組換え酵素を精製し、酵素化学的機能解析および両酵素に対する RMP の阻害実験を行った。

第1章では、*T. brucei* 感染ラットに対する ribavirin の薬効評価を行った。毎日投与で5日間の ribavirin 経口投与 (200 mg kg^{-1}) により、*T. brucei* 感染ラットの生存期間が有意に延長された。また、*T. brucei* 感染ラットの血中原虫濃度を観測した結果、ribavirin 投与期間中は血液中の原虫濃度が検出限界以下まで減少した。これは、ribavirin が抗トリパノソーマ活性を有することを示している。

第2章では、精製された TbIMPDH の機能解析の結果が示されている。超遠心分析により、TbIMPDH のサブユニット構造は7量体であることが示されている。反応速度論的解析により、TbIMPDH の反応速度パラメーターは、 $k_{\text{cat}} = 0.28 \text{ sec}^{-1}$ 、 $K_{\text{m IMP}} = 30 \text{ }\mu\text{M}$ および $K_{\text{m NAD}} = 1300 \text{ }\mu\text{M}$ であり、NAD に対する基質阻害定数が $K_{\text{ii NAD}} = 3.0 \text{ mM}$ であった。また、TbIMPDH の NAD に対する K_{m} 値は、ヒト由来 IMPDH の K_{m} 値よりも 20-200 倍大きいことが判明した。さらに、IMPDH 阻害剤である RMP, mycophenolic acid および mizoribine 5'-monophosphate を用いて得られた阻害定数は、ヒト由来 IMPDH に対する阻害定数と同程度の値を示した。一方、TbIMPDH の NAD に対する親和性は、ヒト由来 IMPDH の NAD に対する親和性と大きく異なることが判明した。以上より、本申請者は、TbIMPDH は7量体を形成するため、NAD に対する結合様式において、4量体を形成するヒト由来 IMPDH の結合様式と異なっており、この NAD 結合部位が本症の薬剤標的

の一つとなるのではないかと考察している。

第3章では、TbGMMPRの同定および機能解析を行った。TbGMMPR遺伝子はゲノムデータベース上に登録されていなかったため、TbGMMPR遺伝子の探索を行うとともに、候補蛋白質の活性測定を行うことにより、GMMPR活性を有する蛋白質を同定し、*T. brucei*がGMMPRを有することを証明した。TbGMMPR遺伝子の解析を行った結果、触媒残基であるシステインは保存されていた。また、ヒト由来GMMPR type2において、基質GMPと相互作用している残基も良く保存されていた。反応速度論的解析を行った結果、反応速度パラメーターは $k_{cat} = 0.5 \text{ sec}^{-1}$ 、 $K_m \text{ GMP} = 89 \text{ }\mu\text{M}$ および $K_m \text{ NADPH} = 12 \text{ }\mu\text{M}$ であった。RMPを用いて酵素阻害を調べた結果、RMP濃度依存的にTbGMMPRの活性が阻害され、1.0 mM RMP存在下においてほぼ完全に阻害し、得られた IC_{50} 値は105 μM であった。一方、1.0 mM RMP存在下において、宿主であるウシ由来GMMPR type1の活性は全く阻害されず、ウシ由来GMMPR type2の活性も約20%の阻害であった。RMPの阻害様式を調べた結果、RMPはTbGMMPRに対して競合阻害を示し、阻害定数は $K_i = 7.6 \text{ }\mu\text{M}$ であった。従って、RMPは*T. brucei*特異的にGMMPRを阻害することが示された。

本学位申請論文は、*T. brucei*がGMMPRを有することを初めて明らかにしており、学術的新規性が高い。また、アフリカトリパノソーマ症に対する新規薬剤のリード化合物としてribavirinを発見するとともに、その標的分子がGMMPRであることを示している。これらの成果は、本症の新規治療に関する重要な知見を与え、寄生虫感染症の研究分野に大きく貢献するものである。よって、最終試験の結果とあわせて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。