

氏名	うちやまなほこ 内山奈穂子
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬博第534号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	抗トリパノソーマ活性成分の探索及びその作用機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 本多義昭 教授 富岡 清 教授 藤井信孝

論文内容の要旨

クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) は、吸血性昆虫サシガメを介してヒトに感染する鞭毛虫類に属する原虫で、中南米ではシャーガス病という重篤な感染症の原因となっている。この疾患は発熱、嘔吐、下痢、さらには心筋障害や消化管障害などを伴って死亡する例も多く、現在4000万人を超える感染者がいると推定されている。しかしこの疾患の治療薬として用いられている nifurtimox や benznidazole には末梢神経炎、精神障害などの副作用がみられることから、新たな薬剤の開発が強く望まれる。そこで本研究では、天然薬物から新たな抗トリパノソーマ活性物質を探索し、その作用機構の解明を試みた。

第一章 抗トリパノソーマ活性成分の探索

T. cruzi の媒介昆虫体内での増殖型であるエピマスチゴートに対する殺虫活性を指標として天然薬物中の抗トリパノソーマ活性物質を探索し、ローレル (*Laurus nobilis* L. の乾燥葉) の MeOH 抽出物から活性成分として guaiane 型セスキテルペンラクトン及び新規 *p*-menthane 型モノテルペンヒドロペルオキシドを単離した。また、ウズベキスタン産シソ科ムシャリンドウ属植物 *Dracocephalum komarovi* の AcOEt 抽出物から活性成分として、2種のトリテルペン (ursonic acid, urosolic acid) とともに、icetexane 型、20-norabietane 型及び abietane 型の6種の新規ジテルペンと、新規 spirooctahydroindene 骨格を持つジテルペンを単離した。さらにこれら活性成分のうち、キノン構造をもつ化合物 (1) が強い殺虫活性を示したことから、キノン型ジテルペンに着目して抗トリパノソーマ活性物質を探索し、生薬「丹参」(*Salvia miltiorrhiza*) 由来のキノン型ジテルペン (2~5) も *T. cruzi* に対する殺虫活性を持つことを見出した。(Fig. 1)

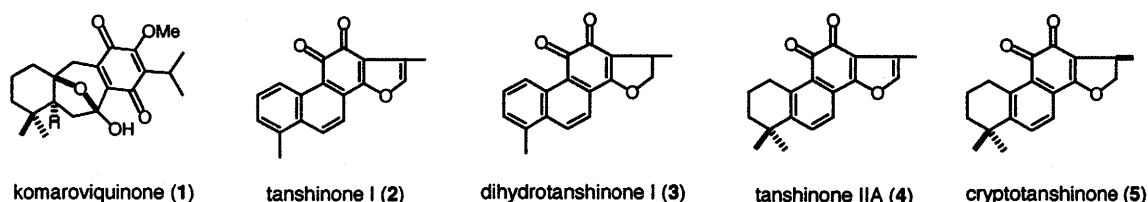


Fig. 1 Trypanocidal quinone-type diterpenes

第二章 キノン型ジテルペンの作用機構の解明

キノン構造を有する化合物の抗トリパノソーマ活性はこれまでも報告されており、これらの化合物は原虫体内で活性酸素種を発生させることにより抗トリパノソーマ活性を示すと考えられている。最近、*T. cruzi* のプロスタグランジン (PG) 生合成に於いて 9, 11-endoperoxide である PGH_2 から $\text{PGF}_{2\alpha}$ への2電子還元を触媒する酵素 (TcOYE) が単離され、この酵素がキノン化合物等の薬物代謝にも関与することが明らかとなった。この酵素は動物には存在しない old yellow enzyme

(旧黄色酵素) 遺伝子ファミリーに属する蛋白質であることから、新しい治療薬の標的としてこの薬物代謝酵素の可能性に注目し、キノン型ジテルペン (1~5) の殺虫活性発現に対する TcOYE の関与について検討した。

第一節 TcOYEによるキノンの還元

TcOYEのcDNAを組み込んだplasmidを作成し、大腸菌の発現系を用いてTcOYEを大量発現させ、得られた酵素を精製し、1~5に対する還元反応を測定した。その結果、TcOYEはNADPHを補因子として1~5の還元反応を触媒し、TcOYEの基質として報告されているキノン化合物 (menadione) に対する還元酵素活性と同程度または2~2.5倍高い値を示した。

第二節 TcOYEによるラジカルの生成

続いて、1~5をNADPH存在下でTcOYEと反応させ、電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いてラジカル生成の有無を調べた。その結果すべての化合物が、嫌氣的条件下ではTcOYEによって特異的に1電子還元されてセミキノンラジカルを生成し、好氣的条件下ではこのラジカルが酸素により再酸化されることでスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) を生成することが明らかとなった。*T. cruzi* に対して抗トリパノソーマ活性を示す薬物の多くは代謝される際に $O_2^{\cdot-}$ の生成を伴い、*T. cruzi* が $O_2^{\cdot-}$ に対して極めて感受性が高いことから、このラジカル生成がこれらキノン型ジテルペン抗トリパノソーマ活性の作用機構の一つと考えられた。(Fig. 2)

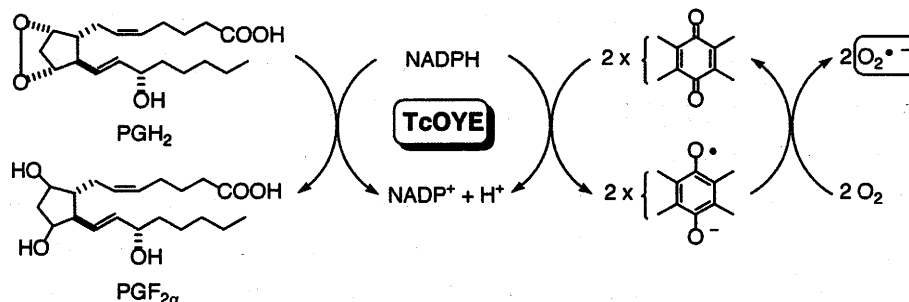


Fig. 2 One and two-electron reduction catalyzed by TcOYE

第三節 原虫のもつ還元酵素としてのTcOYEの関与

次に、TcOYEがどの程度キノン型ジテルペンのラジカルの生成に関与しているか明らかにするために、増殖型エビマスチゴートの粗抽出液に抗TcOYEポリクローナル抗体を加えて免疫沈降した後、1~5に対する還元酵素活性を測定した。その結果、1に対する還元酵素活性は消失した。したがって、TcOYEは1の主要な還元酵素であり、ラジカルの生成に大きく関与していることが示された。

第四節 原虫の各ステージにおけるTcOYEの発現と殺虫活性

原虫の生活環の各ステージでのTcOYEの発現を調べるために、抗TcOYEポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行ったところ、宿主細胞への感染型であるトリボマスチゴート、宿主細胞中での増殖型アマスチゴート、媒介昆虫での増殖型エビマスチゴートとすべてのステージでTcOYEの発現がみられた。また、各ステージでの1の殺虫活性を調べたところ、すべてのステージで殺虫活性がみられた。従って、1の主要な還元酵素であるTcOYEの発現と殺虫活性の発現には相関関係が認められた。

本研究では、新たな抗トリパノソーマ活性物質として新規化合物を含むテルペノイドを単離し、その構造を決定した。さらに、単離した抗トリパノソーマ活性物質のうち、キノン型ジテルペンが*T. cruzi*のPGF_{2α}合成酵素であるTcOYEに1電子還元されてラジカルを生成すること、また原虫のすべてのステージで発現しているTcOYEが1の主要な還元酵素であることを明らかにした。従って、1の殺虫活性にはTcOYEを介したラジカルの生成が大きく関与していることが示された。これは化合物1がシャーガス病の新たな治療薬となりうる可能性を示すものであり、今後TcOYEを標的とした薬剤の開発に重要な知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) は、吸血性昆虫サシガメを介してヒトに感染する鞭毛虫類に属する原虫で、中南米ではシャーガス病という重篤な感染症の原因となっている。この疾患は発熱、嘔吐、下痢、さらには心筋障害や消化管障害などを伴って死亡する例も多く、現在4000万人を超える感染者がいると推定されている。しかしこの疾患の治療薬として用いられている nifurtimox や benznidazole には末梢神経炎、精神障害などの副作用がみられ、新たな薬剤の開発が強く望まれる。そこで本研究では、天然薬物から新たな抗トリパノソーマ活性物質を探索し、その作用機構の解明を行った。

第1章 抗トリパノソーマ活性成分の探索

T. cruzi の媒介昆虫体内での増殖型であるエピマスチゴートに対する殺虫活性を指標として天然薬物中の抗トリパノソーマ活性物質を探索し、ローレル (*Laurus nobilis* L. の乾燥葉) の MeOH 抽出物から活性成分として guaiane 型セスキテルペンラクトン及び新規 *p*-menthane 型モノテルペンヒドロペルオキシドを単離した。さらに、ウズベキスタン産シソ科ムシャリンドウ属植物 *Dracocephalum komarovi* の AcOEt 抽出物から活性成分として、2種のトリテルペン (ursonic acid, urosoic acid) とともに、icetexane 型、20-norabietane 型及び abietane 型の6種の新規ジテルペンと、新規 spiro-octahydroindene 骨格を持つジテルペンを単離した。さらにこれら活性成分のうち、キノン構造をもつ komaroviquinone (1) が強い殺虫活性を示したことから、キノン型ジテルペンに着目して抗トリパノソーマ活性物質を探索し、生薬「丹参」(*Salvia miltiorrhiza*) 由来のキノン型ジテルペンである tanshinone I (2), dihydrotanshinone I (3), tanshinone II A (4), cryptotanshinone (5), も *T. cruzi* に対する殺虫活性を持つことを見出した。

第2章 キノン型ジテルペンの作用機構の解明

キノン構造を有する化合物の抗トリパノソーマ活性はこれまでも報告されており、これらの化合物は原虫体内で活性酸素種を発生させることにより抗トリパノソーマ活性を示すと考えられている。最近、*T. cruzi* のプロスタグランジン (PG) 生合成に於いて 9, 11-endoperoxide である PGH₂ から PGF_{2α} への2電子還元を触媒する酵素 (TcOYE) が単離され、この酵素がキノン化合物等の薬物代謝にも関与することが明らかとなった。この酵素は動物には存在しない old yellow enzyme (旧黄色酵素) 遺伝子ファミリーに属する蛋白質であることから、新しい治療薬の標的としてこの薬物代謝酵素の可能性に注目し、キノン型ジテルペン (1~5) の殺虫活性発現に対する TcOYE の関与について解析した。

すなわち、TcOYE の cDNA を組み込んだ plasmid を作成し、大腸菌の発現系を用いて TcOYE を大量発現させ、得られた酵素を精製し、1~5 に対する還元反応を測定した。その結果、TcOYE は NADPH を補因子として 1~5 の還元反応を触媒し、TcOYE の基質として報告されているキノン化合物 (menadione) に対する還元酵素活性と同程度または 2~2.5 倍高い値を示した。続いて、1~5 を NADPH 存在下で TcOYE と反応させ、電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いてラジカル生成の有無を調べた。その結果すべての化合物が、嫌氣的条件下では TcOYE によって特異的に 1 電子還元されてセミキノンラジカルを生成し、好氣的条件ではこのラジカルが酸素により再酸化されることでスーパーオキシドアニオンラジカル (O₂⁻) を生成することが明らかとなった。*T. cruzi* に対して抗トリパノソーマ活性を示す薬物の多くは代謝される際に O₂⁻ の生成を伴い、*T. cruzi* が O₂⁻ に対して極めて感受性が高いことから、このラジカル生成がこれらキノン型ジテルペン抗トリパノソーマ活性の作用機構の一つと考えられた。

次に、TcOYE がどの程度キノン型ジテルペンのラジカル生成に関与しているか明らかにするために、増殖型エピマスチゴートの粗抽出液に抗 TcOYE ポリクローナル抗体を加えて免疫沈降した後、1~5 に対する還元酵素活性を測定した。その結果、1 に対する還元酵素活性は消失した。したがって、TcOYE は 1 の主要な還元酵素であり、ラジカル生成に大きく関与していることが示された。さらに、原虫の生活環の各ステージでの TcOYE の発現を調べるために、抗 TcOYE ポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行ったところ、宿主細胞への感染型であるトリボマスチゴート、宿主細胞中での増殖型アマスチゴート、媒介昆虫での増殖型エピマスチゴートとすべてのステージで TcOYE の発現がみられた。またこの感染型トリボマスチゴートをヒトの培養細胞である HeLa 細胞の増殖には影響を与えなかったことから、1 の有効性は培養細胞を用いた *in vitro* 実験系で確認された。したがって、1 は主として TcOYE によって還元されてラジカルを生成し、殺虫活

性を発現すると考えられた。

以上の結果は、新規キノン型ジテルペン komaroviquinone (1) がシャーガス病の新たな治療薬となりうる可能性を示すものであり、今後 TcOYE を標的とした薬剤の開発にも重要な知見を与えるものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。