

氏 名	Nguyen Tien Huy
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2 6 5 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	Antimalarial mechanism of antifungal azoles (主査)
審 査 委 員	教 授 原 三郎 教 授 小田 耕平 教 授 田嶋 邦彦 助教授 亀井 加恵子

論文内容の要旨

毎年、世界で約 3 億人が新たにマラリアに感染し、数百万人が死に至っている。マラリアの制御は、殺虫剤耐性の蚊の出現および薬剤耐性マラリアの出現により、非常に困難になっており、新しい抗マラリア薬の開発は緊急を要する。

マラリア原虫は赤血球内でヘモグロビンを分解し、生成するアミノ酸を栄養源とする。その際に遊離されるヘムは細胞毒性を持っており赤血球膜およびマラリア原虫に障害を与える。そのため、マラリア原虫は自身を守るために、ヘムを無毒化する。その機構には、グルタチオン(GSH)によるヘムの分解とヒスチジンリッチプロテイン 2 (PfHRP2) によるヘムの重合がある。PfHRP2 の主要構造は Ala-His-His-Ala-His-His-Ala-Ala-Asp の繰り返しからなっている。PfHRP2 はマラリア原虫液胞中でヘムと結合し、ヘムの重合を開始する。しかし、PfHRP2 はマラリア原虫のサイトゾルや赤血球外にも分泌されており、それらの機能は明らかではない。ヘム無毒化機構は、マラリア原虫の生存にとって必須であり、かつ特異的なものである。したがって、ヘム無毒化機構の阻害は抗マラリア薬を設計するうえで、重要な標的となる。

本研究は、抗マラリア活性を示すアゾール化合物がイミダゾール基を有していることに着目し、アゾール化合物がヘムと結合することおよびヘム無毒化機構の阻害の可能性について検討し、アゾール化合物の抗マラリア機構を解明した。

本学位論文は 4 章からなっている。第 1 章では、アゾール化合物の一種であるクロトリマゾール(CLT)の抗マラリア機構の 1 つを明らかにした。分光学的手法により、CLT はイミダゾール基を介してヘム 1 分子あたり 2 分子が 6 配位で結合し、結合定数 $6.54 \times 10^8 \text{ M}^{-2}$ という強い結合をすることを明らかにした。また、CLT と結合することにより、ヘムの GSH による分解が阻害されることを見いだした。ヘムは疎水性が強い膜と容易に結合し、赤血球の溶血を引き起こす。赤血球の溶血を指標に膜への障害性を検討し、ヘム- CLT 複合体はヘム単独より膜に対する障害性が高いことを明らかにした。すなわち CLT によるヘム無毒化機構に対する効果として、① CLT とヘムの複合体形成、②複合体形成によりヘムの GSH による分解を阻害、③複合体形成による膜障害性の増大を明らかにした。

第 2 章では、ヘム- CLT 複合体による膜障害性がヘム単独の場合より増大する機構を検討した。その結果、CLT は①ヘムの膜に対する結合は促進しない、②ヘムによる膜タンパク質および脂質の酸化は促進しない、③膜に結合したヘムの GSH による分解を阻害する、④低張液中でのヘムによる溶血反応を促進する、ことを見いだした。ヘムによる溶血反応は colloid osmotic

hemolysis によるものであり、ヘム- CLT 複合体の高い膜障害性は CLT のかさ高い分子サイズにより膜に穴が開きやすくなり、膜構造が脆弱になるためと結論した。

第3章では、他の2種のアゾール化合物、ケトコナゾール (Keto) およびミコナゾール (Mico) が CLT と同様に①ヘムと結合すること、②ヘムとの結合様式および結合力が同じであること、③ヘムと複合体を形成しヘムの GSH による分解を阻害すること、④ヘム単独に比べヘムとの複合体は膜に対する障害性が大きいことを明らかにした。さらに、PfHRP2 タンパク質の主要繰り返し配列 Ala-His-His-Ala-His-His- Ala-Ala-Asp を3回持つ27残基のペプチド (R27) を合成し、R27 はヒスチジン残基のイミダゾール基を介してヘムと結合するが、CLT、Mico、Keto のいずれのアゾール化合物もヘム- R27 複合体からヘムを引き抜き、ヘムと結合することを見いだした。すなわち、3種のアゾール化合物はいずれも、GSH によるヘムの分解を阻害するだけでなく、PfHRP2 によるヘムの重合も阻害することを見いだした。

第4章では、PfHRP2 の機能を解明するため、PfHRP2 タンパク質の主要繰り返し配列 Ala-His-His-Ala-His-His- Ala-Ala-Asp を2回および3回持つ18残基(R18)および27残基(R27)のペプチドを合成し、ヘムとの相互作用を解析した。その結果、①R27 は PfHRP2 とほぼ同程度の結合力でヘムと相互作用すること、②R18、R27 いずれもヘムによる溶血を阻害すること、③R27 は膜中に存在するヘムを膜から引き抜きヘムと結合することを明らかにした。以上より、PfHRP2 は膜に障害を与えるヘムを膜から引き抜くことで、より積極的にマラリアをヘムの毒性から防御していることを明らかにした。

以上より、アゾール化合物はマラリア原虫のヘム無毒化機構を妨害することを明らかにした。すでに、CLT はカルシウムチャンネルの働きを抑制することが報告されている。したがって、アゾール化合物の抗マラリア機構は、マラリア原虫内のカルシウム濃度のかく乱とヘム無毒化機構の阻害の両方から成り立っているものと考えられる。Mico は経口投与によりマラリアの増殖が抑制されるほどの血中濃度にはならないことが報告されているが、CLT および Keto は十分な血中濃度が得られることおよび深刻な副作用が無いことが証明されている。したがって、アゾール化合物は抗マラリア薬として非常に有望な薬剤であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

マラリアは言うまでもなく熱帯地域における最重要疾病であり、死者は年々300万人にも達する。キニーネやクロロキンという特効薬があるが、すでにこれらの薬剤に耐性なマラリア原虫による被害が拡大している。新薬の開発が待たれている。

申請者は、抗真菌薬であるアゾール類が抗マラリア原虫活性をもっていることに着目して、アゾール類の1種であるクロトリマゾールを用いてその作用機構を解明した。

マラリア原虫は、エネルギー源として用いる赤血球中のヘモグロビンから派生するマラリア原虫にとって有害なヘムを無毒化する2つの方法をもっている。1つはヒスチジンリッチプロテインによるヘムの捕捉と重合による無毒化であり、もう1つは還元型グルタチオンによるヘムの分解である。

申請者は、ヘムとクロトリマゾールが複合体を形成すること、この複合体はヘム単独より強力な細胞膜破壊作用を有すること、クロトリマゾールがヒスチジンリッチプロテインに結合したヘムを引き抜いて複合体を形成すること、を見出し、クロトリマゾールはキニーネやクロロキンと

は異なった機構の抗マラリア作用を示すことを明らかにした。また、クロトリマゾールとヘムの複合体は還元型グルタチオンによる分解を受けないことを証明した。

クロトリマゾールは、カンジダなど真菌症の治療薬として使用されており、新しいマラリア治療薬として使用できる可能性が極めて高いことが証明された。論文内容の新規性は言うまでもなく、実用性のある新規抗マラリア薬を見出したことは、世界的に深刻な人的被害を軽減する可能性を提唱したことを意味し、高く評価できる。博士学位論文として十分な内容を持つものである。

本論文の内容の一部は、以下に示す二つの国際的学術雑誌に公表されている。

1. Nguyen Tien Huy, Kaeko Kamei, Takushi Yamamoto, Yoshiro Kondo, Kenji Kanaori, Ryo Takano, Kunihiko Tajima, and Saburo Hara, Clotrimazole binds to heme and enhances heme-dependent hemolysis: proposed antimalarial mechanism of clotrimazole. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4152-4158 (2002)
2. Nguyen Tien Huy, Kaeko Kamei, Yoshiro Kondo, Satoshi Serada, Kenji Kanaori, Ryo Takano, Kunihiko Tajima, and Saburo Hara, Effect of antifungal azoles on heme detoxification system of malaria. *Journal of Biochemistry*, 131(3), 437-444 (2002)