

氏 名	ぐえん たん とうい にえん NGUYEN THANH THUY NHIEU
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5 5 1 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 25 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	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on <i>Porphyromonas gingivalis</i> hemoglobin receptor and some antimalarial drug candidates (<i>Porphyromonas gingivalis</i> ヘモグロビンレセプターおよび抗マラリア薬候補物質に関する研究)
審 査 委 員	(主査)教授 原田繁春 教授 竹谷 茂 教授 山口政光 准教授 亀井加恵子

論文内容の要旨

ヘムは、ヘモグロビン、ミオグロビン、チトクロムなど様々なタンパク質の機能に必須であり、生体にとって不可欠な分子である。しかし、遊離ヘムは細胞膜に結合して透過性を向上させるため、細胞を死に至らしめる。また、ヘムは過酸化力を持つため、脂質、タンパク質や DNA を傷害する。ヘムが持つこれらの毒性のために生体内では遊離ヘムの濃度は低く保たれているが、マラリアなどの感染症や鎌状赤血球、重症溶血性貧血などにおいてヘモグロビンが分解され、高濃度のヘムが遊離する。したがって、これらの疾病における遊離ヘムと病態との関係、遊離ヘムの無毒化機構などの解明は、治療薬の開発といった観点からも重要である。

本論文は、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* とマラリア原虫に着目し、それらのヘム無毒化機構およびそれを標的とする薬剤に関する研究をまとめたものであり、5 章から構成されている。第 1 章は序論であり、ヘムの生理的役割、構造、毒性、感染症におけるヘムの役割、その無毒化機構について説明している。さらに、*P. gingivalis* が生産するプロテアーゼ・ジンジパインとそのヘモグロビンレセプター、マラリア原虫におけるヘム無毒化機構などについて解説するとともに、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章では、グラム陰性偏性嫌気性細菌 *P. gingivalis* が生産するタンパク質ジンジパインのヘモグロビンレセプター (HbR) ドメインによるヘム中和機構について明らかにした。*P. gingivalis* は歯周病の原因細菌であり、菌体表面および菌体外に強力なプロテアーゼを産生する。その中でもジンジパインは主要なプロテアーゼであり、宿主タンパク質を分解することによって歯周病に関連する種々の病態に関与する。ジンジパインは単量体として菌体外に分泌されるだけでなく、外膜上に存在し、ヘモグロビン結合性や赤血球凝集性などの機能も有している。ヘムは *P. gingivalis* にとって必須であり、ヘムの獲得にジンジパインが関わっている。ジンジパインの赤血球凝集ドメインが歯周ポケットの赤血球を凝集し、プロテアーゼ活性によって赤血球を溶解する。HbR ドメインがヘモグロビンと結合し、捕捉する。さらに、プロテアーゼ活性によってヘモグロビンを分解し、*P. gingivalis* がヘムを獲得すると考えられている。本論文では、赤血球をモ

デルとして用い、ジンジパインの HbR ドメインがヘミンによる溶血を抑制することを見出した。これは、HbR ドメインが遊離ヘムの毒性を中和する機能を持つことを示している。さらに、HbR は赤血球膜とヘミンの結合を阻害し、さらに膜に結合したヘミンを膜から引抜くことを明らかにした。分光法による解析の結果、HbR はヘミンを μ -oxo ダイマーに変換することを見出した。 μ -oxo ダイマーを化学合成し、細胞傷害性を赤血球の溶血によって評価した結果、 μ -oxo ダイマーはヘミンよりも溶血を引き起こす程度が小さいことを見出した。 μ -oxo ダイマーでは、2 分子のヘムが持つ計 4 個のカルボキシル基が電気的な反発のために互いにできるだけ遠くなるように配置されると考えられる。そのため、カルボキシル基が持つ負電荷が分散され、ヘムのポルフィリンリングと膜の疎水結合が妨げられると予想される。これが、ヘミンと比較して μ -oxo ヘムダイマーの膜傷害性が小さい原因である。以上の結果から、HbR ドメインは遊離ヘムと結合し、遊離ヘムの細胞膜への結合を阻害するだけでなく、遊離ヘムを μ -oxo ダイマーに変換することによって、ヘムから細胞膜を保護することが明らかとなった。これは、HbR の新しい機能であり、歯周ポケットにおける *P. gingivalis* の外膜を保護している可能性を示唆している重要な知見である。

第 3 章では、HbR によるヘム結晶化阻害についての研究をまとめている。マラリア原虫など赤血球に寄生し、ヘモグロビンを栄養源として分解・吸収する原虫にとって、その過程で遊離するヘムの無毒化はその生存に必須である。マラリア原虫においてヘム結晶（ヘモゾイン）形成が最も重要なヘム無毒化機構であることから、ヘム結晶化機構は抗マラリア薬の重要なターゲットである。ヘミンを用いて *in vitro* で HbR のヘム結晶化阻害能を検討した結果、HbR はヘム結晶化を濃度依存的に阻害することを見出した。ヘムは水溶液中で π - π スタッキング相互作用によってダイマーを形成しているが、モノマーヘムとの平衡状態にあると考えられる。HbR はモノマーヘムを μ -oxo ダイマーに変換するため、その結果、結晶化が阻害されるものと考えられる。本研究ではさらに、HbR のアミノ酸配列に基づいてペプチドを化学合成し、ヘム結晶化阻害能を有する配列を VASFSWNGMA および YYAVNDGFPG と特定した。これらの配列は抗マラリア薬の設計に重要な情報を与えると考えられる。

第 4 章では *t*-ブチルプリマキン (BPQ) の赤血球期のマラリア原虫に対する抗マラリア機構についての研究を述べている。ヘム結晶化阻害能を付与した薬剤は赤血球期のマラリア原虫に対して抗マラリア活性を有することが期待される。抗マラリア薬プリマキン(PQ)は肝臓休眠期の原虫に対して活性を示すが、赤血球期原虫に対する抗マラリア活性は持たないことが知られている。一方、PQ のキノリンリングに *tert*-ブチル基を付加した BPQ は、赤血球期原虫に対して抗マラリア活性を持つ。そこで、BPQ の赤血球期原虫に対する抗マラリア機構はヘム結晶化阻害にあるとの仮説を立て、BPQ の抗マラリア機構を *in vitro* で検討した。その結果、BPQ は PQ に比べ、ヘム結晶形成を有意に阻害した。BPQ はヘミンと 1:1 で複合体を形成したが、PQ はヘミンと複合体を形成しなかった。また、BPQ とヘミンの結合定数は $K_a = 0.61 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。ヘミン-BPQ 複合体はヘミン単独の場合よりも低濃度で赤血球を溶血させることが分かった。これらの結果より、BPQ は赤血球期のマラリア原虫内でヘムと結合することによってヘム結晶化を阻害するとともに、ヘミン-BPQ 複合体がマラリア原虫細胞膜に傷害を与えることによって、抗マラリア機構を発揮するものと考えられる。BPQ のヘミンに対する結合力が PQ より大きい原因として、PQ のキノリンリングの C-2 位に *tert*-ブチル基が付加することによって、キノリンリングとヘムのポルフィリンリングとの疎水的相互作用が強められるためであると考えられる。本研究によって得

られた知見は、遊離ヘムが関係する感染症の治療薬開発に重要な知見を与えるものである。
第5章は結論であり、本研究成果を総括している。

論文審査の結果の要旨

多くの感染症において、病原体は栄養源を得るためや増殖のために宿主の組織やタンパク質等を分解する。ヘモグロビンを始めとするヘムタンパク質の分解により毒性の強いヘムが遊離するため、いくつかの病原体はヘムを無毒化する機構を有する。よって、それらの感染症においてヘム無毒化機構は治療薬の標的となり得る。本研究は、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* が生産するプロテアーゼ・ジンジパインのヘモグロビンレセプタードメインのヘム中和機構を解析するとともに、マラリア原虫のヘム無毒化機構阻害の観点から抗マラリア薬候補物質に関する研究を行った。

本論文の前半部は、*P. gingivalis* が生産するジンジパインのヘモグロビンレセプタードメイン (HbR) が遊離ヘムを結合することに着目した。本研究では、赤血球をモデルとして用い、HbR がヘミンによる溶血を抑制することを見出した。また、HbR ドメインは遊離ヘムと結合して遊離ヘムの細胞膜への結合を阻害し、細胞膜に結合したヘムを膜から引き抜くことでヘムから細胞膜を保護していることを明らかにした。さらに、HbR はヘムモノマーをより細胞膜への障害性が小さい μ -oxo ダイマーに変換することを見出した。これら HbR のヘム中和活性は新しい機能であり、歯周ポケットにおける *P. gingivalis* の外膜を保護している可能性を示唆している重要な知見である。

続いて、HbR および *t*-ブチルプリマキン (BPQ) によるヘム結晶化阻害について検討している。マラリア原虫においてヘム結晶 (ヘモゾイン) 形成が最も重要なヘム無毒化機構であることから、ヘム結晶化機構は抗マラリア薬の重要なターゲットである。ヘミンを用いて *in vitro* で HbR のヘム結晶化阻害能を検討した結果、HbR はヘム結晶化を濃度依存的に阻害することを見出した。さらに、ペプチドを化学合成し、ヘム結晶化阻害能を有する HbR のアミノ酸配列を特定した。この配列は抗マラリア薬の設計に重要な情報を与えると考えられる。

抗マラリア薬プリマキン(PQ)は肝臓休眠期の原虫に対して活性を示すが、赤血球期原虫に対する抗マラリア活性は持たないことが知られている。一方、PQ に *tert*-ブチル基を付加した BPQ は、赤血球期原虫に対して抗マラリア活性を持つ。そこで、BPQ の赤血球期原虫に対する抗マラリア機構はヘム結晶化阻害にあるとの仮説を立て、BPQ の抗マラリア機構を *in vitro* で検討した。その結果、BPQ は赤血球期のマラリア原虫内でヘムと結合することによってヘム結晶化を阻害するとともに、ヘム-BPQ 複合体がマラリア原虫細胞膜に傷害を与えることによって、抗マラリア機構を発揮するも可能性を見出した。本研究によって得られた知見は、遊離ヘムが関係する感染症の治療薬の開発に重要な知見を与えるものである。

以上、本学位論文は感染症におけるヘムに関する貴重な研究成果をまとめたものである。新規な知見を含んでおり、ヘム無毒化機構を標的とした薬剤の論理設計をする上で重要な意義を持つ論文である。なお、本論文は、査読付の論文誌に採録が受理された以下の学術論文をもとにしている。

1. Nguyen Thanh Thuy Nhen, Nguyen Tien Huy, Mariko Naito, Tatsuo Oida, Dinh Thanh Uyen, Mingguo Huang, Mihoko Kikuchi, Shigeharu Harada, Koji Nakayama , Kenji Hirayama , and Kaeko Kamei. Neutralization of Toxic heme by *Porphyromonas gingivalis* hemoglobin receptor. *J. Biochem.*, 2009 Oct 27. [Epub ahead of print]
2. Nguyen Tien Huy, Keisuke Mizunuma, Kirandeep Kaur, Nguyen Thanh Thuy Nhen, Meenakshi Jain, Dinh Thanh Uyen, Shigeharu Harada, Rahul Jain, and Kaeko Kamei. 2-*tert*-Butyl-8-quinolinamines **exhibit** potent blood schizontocidal **antimalarial** activity via inhibition of **heme** crystallization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), pp. 2842-2847 (2007)