京都工芸繊維大学

氏　　名	でぃん　たん　　うぃん DINH　THANH　UYEN
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　５１７　号
学位授与の日付	平成 20 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 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	Anti-malaria: Studies on the mechanism of hemozoin formation and high-throughput screening assays for new anti-heme crystallization drugs （抗マラリア：ヘモゾイン形成機構および抗ヘム結晶化薬のハイスループットなスクリーニング方法に関する研究）
審査委員	(主査)教授　原田繁春 教授　山口政光 教授　田嶋邦彦 准教授　亀井加恵子

論文内容の要旨

マラリアは年間数百万人が死に至る熱帯域での最も重要な感染症のひとつである。現在までに有効なワクチンは開発されておらず、また既存の抗マラリア薬に対して耐性を獲得したマラリア原虫が出現するなど、マラリアの制圧は未だに困難な状況である。マラリア原虫は感染赤血球内で宿主のタンパク質であるヘモグロビンを分解し、栄養源とする。その際に遊離するヘムは過酸化力を持ち、細胞膜に傷害を与えるため、マラリア原虫は自身を守るためにヘムを無毒化する。マラリア原虫のヘム無毒化機構にはいくつかの経路があるが、最も主要な経路はヘム結晶(ヘモゾイン)の形成である。ヘム結晶化はマラリア原虫に特異的かつその生存に必須であるため、マラリア原虫のヘム結晶化機構は抗マラリア薬の重要なターゲットのひとつである。本論文は、新規抗マラリア薬の開発を目指した研究をまとめたものであり、ヘム結晶化機構の解明およびヘム結晶化阻害剤の新規スクリーニング方法の開発に関する研究成果を含んでいる。

本論文は、全 6 章から構成されている。第 1 章は序論であり、マラリア原虫について概説するとともに、マラリア原虫のヘム無毒化機構、ヘム結晶化機構、ヘム結晶化阻害を基盤とする抗マラリア薬について説明し、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章と第 3 章はヘム結晶化機構に関する研究成果を述べている。第 2 章では、マラリア原虫内でのヘム結晶化のモデルとして、低分子直鎖アルコールによって誘導される試験管内でのヘム結晶化に関する研究成果をまとめている。直鎖アルコールによるヘム(ヘミン)の結晶化促進効果はアルコールの炭素鎖が長いほど大きいことから、ヘム結晶化にはアルコールの炭素鎖とヘムの疎水性相互作用が関与していることを明らかにした。直鎖アルコール溶液中でのヘムの吸収スペクトルを解析することにより、マラリア原虫食胞内と同じ酸性条件下においてヘムはπ-πスタッキングによって凝集しているが、アルコール添加にともなって凝集体が解離してモノマーとなることを明らかにした。ヘムの結晶構造から、ヘム結晶の構成ユニットであるヘモゾインダイマーを形成するためには、凝集体がいったん解離する必要があると考えられる。本研究から得られた知

見はその仮説を支持するものである。さらに、アルコール添加に伴ってヘムの溶解度が上昇、逆に溶媒の表面張力が低下することを明らかにした。これらの知見より、直鎖アルコール溶液中ではヘムとアルコール炭素鎖との疎水性相互作用や溶媒の表面張力低下によって、酸性条件下でのヘム凝集体の解離が促進され、さらに結晶化の活性化エネルギーが低下することによってヘム結晶化が促進されると考察している。

第 3 章では、ヘム結晶化に対するアミノ酸の効果について検討し、トリプトファンを除く疎水性アミノ酸はヘム結晶化を促進するのに対し、塩基性アミノ酸およびシステインがヘム結晶化を阻害することを明らかにしている。これらの知見に基づき、インドール骨格を持つ抗マラリア薬や塩基性アミノ酸を結合した抗マラリア薬の抗マラリア機構について考察している。

第 4 章および第 5 章は、ヘム結晶化阻害剤の新規スクリーニング方法の開発について記述している。第 4 章では、界面活性剤 Tween20 をヘム結晶化の促進剤として用い、ヘムの吸収(415nm)およびヘム結晶の濁度(630nm)をマイクロプレートリーダーで測定することによって、ヘム結晶化阻害活性を簡便でハイスループットに測定する方法を開発した。また、既存の抗マラリア薬クロロキンおよびキニーネを用いて、本研究で開発した方法の有効性を示している。

第 5 章では、第 4 章で開発した分光法によるヘム結晶化阻害剤の新規スクリーニング方法の改良について記述している。分光法によるスクリーニング方法では着色物質の場合、その内在性の吸収のために正確なヘム結晶化阻害活性を定量できない。本研究では、黄色、赤色、青色の各種色素とヘムとの混合溶液の吸収スペクトルを詳細に解析し、黄色色素、赤色色素の場合はヘム結晶を 750nm の吸収、青色色素の場合はヘムを 405nm の吸収によって検出することによって、色素由来の吸収の妨害を受けないでヘム結晶化阻害活性を測定できることを明らかにしている。

第 6 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

本学位論文は、新規抗マラリア薬を開発するうえで最も重要なターゲットの一つであるマラリア原虫のヘム結晶化機構に着目して研究を行ったものである。

本論文の前半部分において、低分子直鎖アルコールがヘム結晶化を促進することに着目し、その機構を解析している。その結果、マラリア原虫の食胞内と同じ酸性条件においてヘムは凝集体として存在し、結晶化するためにいったんモノマーに解離することを見出した。アルコールを用いた人工的な条件での研究であるが、本知見はマラリア原虫におけるヘム結晶化機構の解明につながる貴重なものである。また、ヘム結晶化に対するアミノ酸の効果を解析した結果、塩基性アミノ酸がヘム結晶化を阻害することを見出し、塩基性アミノ酸を結合した抗マラリア薬の抗マラリア機構について考察した。本成果はより有効な抗マラリア薬を開発につながる成果である。

本論文の後半部分では、ヘム結晶化阻害剤のスクリーニング方法の開発についての研究成果がまとめられている。本研究によって開発された方法は、結晶化促進剤として界面活性剤 Tween20 を用い、分光法によってヘムの吸収とヘム結晶の濁度を測定することによってヘム結晶化阻害を解析するものである。さらに、各種色素とヘムの混合溶液の吸収スペクトルを詳細に解析することにより、着色物質のヘム結晶化阻害活性を解析する方法を開発した。マラリア原虫を用いる煩雑な操作や有毒な試薬を必要とする従来方法と比較し、本研究で開発された方法は安全かつ簡便

である。今後、新規抗マラリア薬の開発が促進されることが期待される研究成果である。

以上、本学位論文は新規抗マラリア薬を開発する上で貴重な研究成果をまとめたものであり、大き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された以下の学術論文をもとにしている。

1. N.T.Huy, A.Maeda, D.T.Uyen, D.T.X.Trang, M.Sasai, T.Shiono, T.Oida, S.Harada, K.Kamei：Alcohols induce beta-hematin formation via the dissociation of aggregated heme and reduction in interfacial tension of the solution.Acta Tropica,Vol.1O1,No.2,pp. 130-138,2007.
2. D.T.Uyen, N.T.Huy, D.T.X.Trang, N.T.T.Nhien, T.Oida, K.Hirayama, S.Harada, K.Kamei：Effects of amino acids on malarial heme crystallization.Biologica1 & Pharmaceutical Bulletin, Vol.31,No.8,pp.1483-1488,2008.
3. N.T.Huy, D.T.Uyen, A.Maeda, D.T.X.Trang, T.Oida, S.Harada, K.Kamei：Simple colorimetric inhibition assay of heme crystallization for high-throughput screening of antimalarial compounds.Antimicrobia1 Agents and Chemotherapy,Vol.51,No.1,pp.350-353, 2007.