

Title	大腸菌において発現させた熱帯熱マラリアジヒドロ葉酸還元酵素の酵素学的解析
Author(s)	佐野, 元市郎
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3109907
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

博士論文

大腸菌において発現させた熱帯熱マラリアジヒドロ葉酸
還元酵素の酵素学的解析

大阪大学大学院理学研究科
生理学専攻

佐野元市郎

1996年

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心に御指導して下さった
小川英行教授、堀井俊宏助教授に心から感謝致します。
また常に貴重なご意見を頂いた森松克実博士、三田村俊秀博士、
板井昭子博士、富岡伸夫博士と、共同実験者のReynolds.K.B.Brobey 様、
豊田哲郎 様、森川智博様に深く感謝致します。
Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体を提供して下さった
武田薬品工業の協力に感謝いたします。

最後に微生物病研究所分子原虫学分野の皆様のご協力に感謝いたします。

要旨

熱帯熱マラリア原虫DHFRを生化学的に解析するためマラリアDHFRを大腸菌を用いて大量に調製する系を構築した。大腸菌における発現効率を良くするためにcDNAのコドン使用頻度を大腸菌型にした人工遺伝子を合成DNAを用いて再構築した。マラリアDHFRはチミジル酸合成酵素(TS)と一本のポリペプチド上に存在するが、DHFR部分と考えられる227番目のアミノ酸までの部分をコードするように遺伝子を設計した。再構築したマラリアDHFR遺伝子と大腸菌を用いて精製したマラリアDHFRのミカエリス定数を測定したところ、マラリア原虫より直接調製されたDHFR-TSの示す、酵素活性のパラメーターに、必ずしも近似した値を示さなかった。一方N,C両末端を様々に変化したDHFR遺伝子を12種類構築し、これらを用いて酵素活性を測定したところ、231個のアミノ酸によって構成されるマラリアDHFRは原虫より直接調製したDHFR-TSに非常に近い値を示した。

数々の熱帯熱マラリア薬剤耐性株の遺伝子解析よりDHFR-TS遺伝子の特定の位置に薬剤に対する耐性に応じて点突然変異が存在する事がこれまでに報告されているが、それが直接マラリアの薬剤に対する耐性に結びついているのかは明らかになっていなかった。熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性機構を調べるために構築した薬剤感受性型のマラリアDHFR遺伝子に上記の情報をもとに点突然変異を導入し、薬剤耐性型の原虫株に由来する4種類のDHFR遺伝子を作成した。薬剤耐性型DHFRを調製し抗マラリア剤に対する親和性を調べたところ、薬剤感受性型DHFRのものより低下しておりマラリア原虫が獲得した耐性機構は標的酵素と阻害剤の親和性を低下させる事によることを示した。

新たに構築した生化学的実験系はこれまで抗マラリア剤の開発を困難にしてきた薬剤のスクリーニングを格段に容易なものにする。これまで用いられた培養マラリア原虫の系に比べ、新たに構築した生化学的実験系は経済的、時間的な面ではるかに優れている。約120種類のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine誘導体についてマラリアDHFRとウシDHFRに対する阻害効果を測定し、選択性が25倍以上ある化合物の阻害活性をさらに薬剤耐性型マラリア原虫DHFRについて調べた。選び出した化合物が実際に培養液中の薬剤感受性型、耐性型の熱帯熱マラリア原虫の増殖を阻害するかを調べた。その結果、生化学的実験系における阻害効果を反映する増殖阻害効果を培養マラリア原虫の実験系で確認した。

この成果は、生化学的解析が遅れているマラリア原虫のジヒドロ葉酸還元酵素を解析し、薬剤耐性型突然変異による酵素蛋白質の構造変化と機能変化について関連付け、その機構を予測することと、効率的な抗マラリア剤のスクリーニングを可能にした。

序論

マラリアは *Plasmodium* 属の原生動物によって引き起こされる病気で、この仲間には現在 120 種程報告されているが、ヒトに感染するものは熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*) の 4 種である。これらの原虫は、*Anopheles* 属の蚊を介して人に感染する。その生活環は寄生生活を行うため他の生物種に比べて非常に複雑である。マラリア原虫の生活環を大まかに述べると以下のようになる (図-1)。

マラリア原虫感染蚊に刺されると、スポロゾイト (sporozoite) が人体内に注入される。スポロゾイトは数分のうちに肝細胞に入り、多数分裂して分裂体 (shizont) になり、細胞中に 1000-10000 個のメロゾイト (merozoite) を生ずる。肝細胞を破壊してメロゾイトが出、その後赤血球に侵入して早期栄養体 (early trophozoite)、後期栄養体 (late trophozoite) となる。ついで分裂が起こり幼若分裂体、(young schizont)、成熟分裂体 (mature schizont) となり、16-24 個のメロゾイトになる。その後メロゾイトは赤血球より放出され、他の赤血球に侵入し同様のサイクルを繰り返す。この増殖サイクルを赤血球内発育という。これを繰り返すうち一部の原虫は雄性生殖母体 (microgametocyte) と雌性生殖母体 (macrogametocyte) となる。これらは蚊に吸われると有性生殖を営むが、蚊に吸われないと早晩死滅する。蚊に吸われた雄性生殖母体は蚊の中腸内で成熟し、約 8 個の雄性生殖体 (microgamete) を生ずる。一方雌性生殖母体は雌性生殖体 (macrogamete) となる。雄性生殖体と雌性生殖体は合体し、融合体 (zygote) を生ずる。これは運動性を持った細長い虫様体 (ookinete) となり蚊の中腸壁に侵入し、外膜下で球状の虫様体 oocyst を形成する。これは次第に大きくなり中に多数のスポロゾイトを形成し、破れてこれを体内に放出する。このスポロゾイトが蚊の唾液線に移行し、吸血時に吻を通して注入される。

マラリア原虫は以上のように複雑な生活環と優れた寄生適応は宿主の免疫系による攻撃をうまくかわすことを可能にしている。血流に直接さらされるメロゾイトのステージでは表面抗原を頻繁に変えることによって宿主の免疫系を攪乱し (Tanabe.K., et al 1987; McBride.J.S., et al 1985)、免疫系による直接的な攻撃をかわせる赤血球内のステージにおいても細胞膜に現れる何百種類もの抗原遺伝子の発現を頻繁に変化させたりしている (Baruch.D.I., et al 1995, Xin-zhuan Su., et al 1995, Smith.J.D., et al 1995)。このような優れた免疫回避機構のため、マラリアワクチンの開発はこれまでのところは成功していない。

その一方で入りクロロキン (chloroquine) やピリメサミン (pyrimethamin) などの抗マラリア剤が開発され、媒介蚊対策を含めて強力なマラリア対策が推進された。しかしその成果は挙がらず、最近ではむしろ患者数の増加傾向が見られている。その理由としては、発生地を占める熱帯地発展途上国の経済事情や、DDT などの殺虫剤の人体に対する発癌性、媒介蚊の耐性獲得などの他に薬剤耐性原虫の問題がある。

蚊体内（有性生殖）

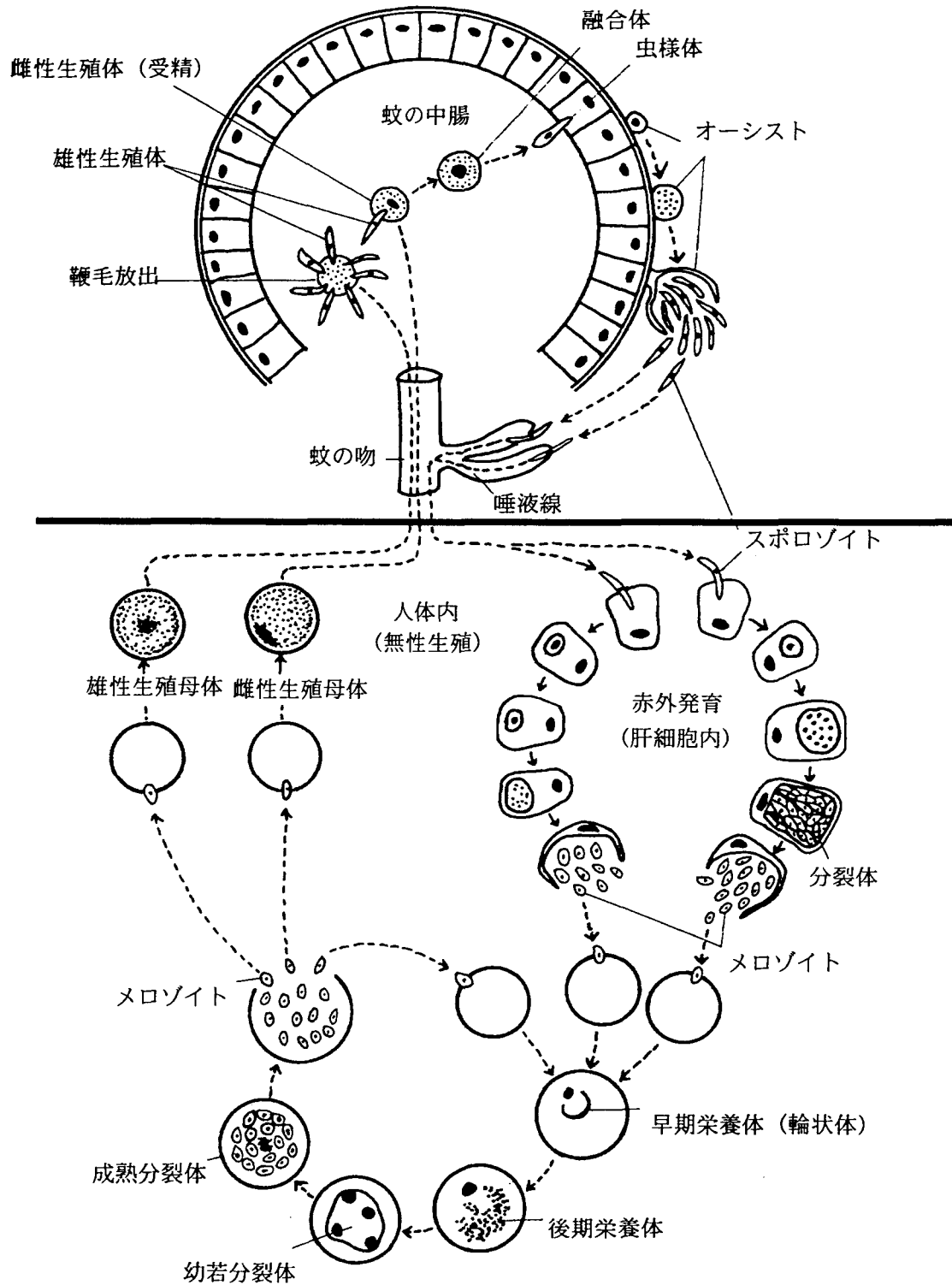


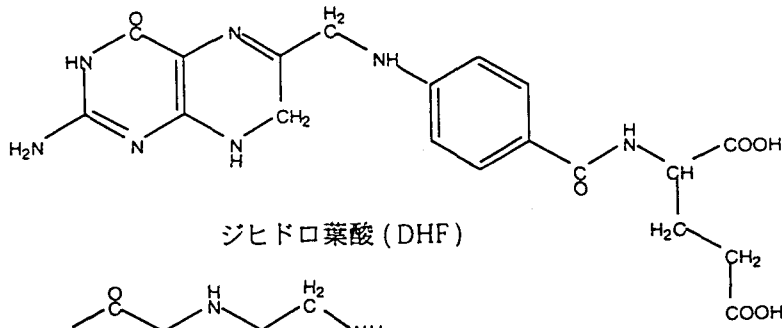
図-1 熱帯熱マラリアの生活環 南山堂図説人体寄生虫学 吉田幸雄著より

17世紀より使用されてきたとされるキニーネ (quinine) に対する耐性株はすでに1910年に報告されている。またそのキニーネの化学構造を元に開発され、効果と安全性においてほぼ決定的であったクロロキンに対してまで耐性を示す耐性株はほとんど全発生地に拡大し、地域的には多剤耐性株も問題となっている。これまでに数多くの抗マラリア剤が開発され、使用されてきたが遅くて10年、早くも2-3年でその耐性株が報告され (WHO., 1988)、新薬の開発が手詰りになってきている観すらある。現在タイなどの研究機関で種々の既存及び新薬の合剤による治療実験が行われているが、決定的な組み合わせは見いだされていない。そのため新しい抗マラリア剤の開発と、これまでにマラリア原虫が獲得してきた薬剤耐性機構の解明が急務の課題となっている。

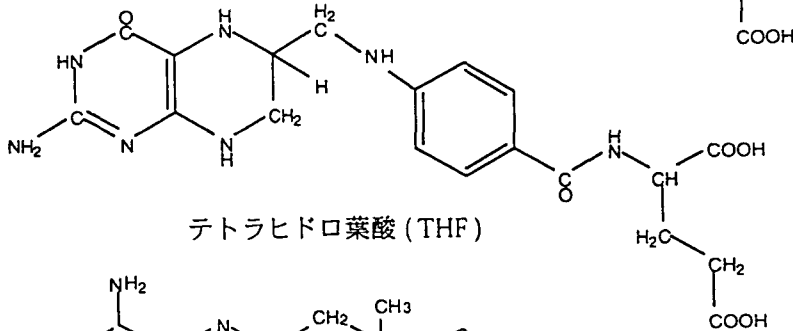
これまでに数多くの抗マラリア剤が開発使用され、そしてそれらに対して耐性を獲得したマラリア原虫株が報告されているが、すくなくとも臨床で実際に使用されている薬剤のうち、その標的がはっきりしているのはピリメサミン (pyrimethamine) やプログアニル (proguanil) だけである。ピリメサミンやプログアニルは毒性大腸菌のジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) を阻害するトリメトプリムのアナログとして開発され、これまで抗マラリア剤として広く使われてきた (図-2)。DHFRは葉酸代謝の中心的役割を担っている酵素で、その働きを止められるとdTMPが産生されなくなり、DNA複製が止められてしまう (図-3)。一般に大腸菌や乳酸菌などの原核生物とニワトリ、ヒトなどの脊椎動物の間ではそれらのDHFRの基本的な構造は保存されているが (Volz.K.W., et al 1982)、アミノ酸の相同性は生物種間で-25%しかなく、薬剤に対する選択性は大きく (Baker.B.R., and Jordan.J.H., 1965)、トリメトプリムなどDHFR阻害剤の標的酵素となった。

一般に生物が薬剤に対し耐性を持つ機構は薬剤に対する分解または修飾による不活性化、薬剤の標的の量的、質的变化、細胞膜の透過孔の減少、又は排出機構に大別される。世界各地の罹患地域より単離したDHFR阻害剤に対する耐性を獲得した株と獲得しなかった株の解析により、細胞内における薬剤蓄積量は薬剤耐性型マラリア原虫と感受性型とでは変わらないこと (Dickman.A., and Jung.A., 1986) と、マラリア染色体当たりのDHFR遺伝子の数は1つだけであることが示された (Cowman.A.F., et al 1988, Peterson.D.S., et al 1988, Foote.S.J., et al 1990, Peterson.D.S., et al 1990)。一方でそれらの耐性株は薬剤の標的酵素をコードしている遺伝子の特定の位置に点突然変異を持っている事が明らかになった (Cowman.A.F., et al 1988, Peterson.D.S., et al 1988, Snewin.V.A., et al 1989, Zolig.J., et al 1989, Tanaka.M., et al 1990, Foote.S.J., et al 1990, Inselburg.J., et al 1988, Peterso D.S., et al 1990)。遺伝子解析された耐性株は薬剤に対する耐性の強さも培養系によって調べられ、点突然変異の数が増えるほど薬剤に対する耐性が向上する傾向が示された (表-1)。

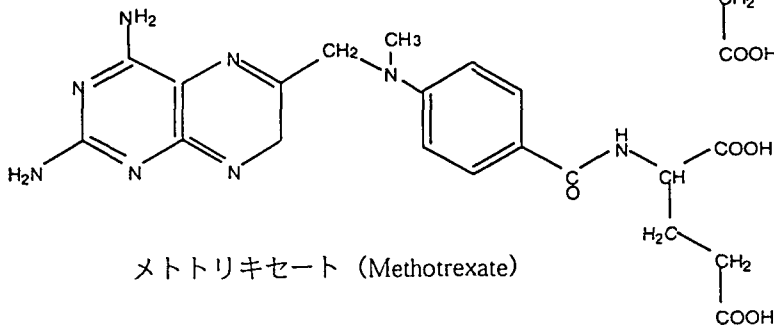
以上の知見より熱帯熱マラリア原虫がDHFR阻害剤に対して獲得した耐性の機構は標的酵素上に起こった点突然変異に起因する活性中心と阻害剤の親和性の低下に依るものと考えられている。従ってこれまで抗マラリア剤として使用されてきたDHFR阻



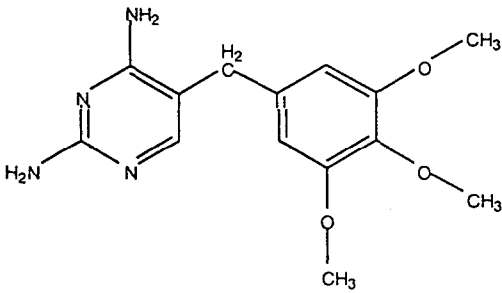
ジヒドロ葉酸 (DHF)



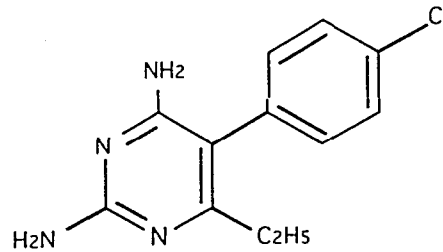
テトラヒドロ葉酸 (THF)



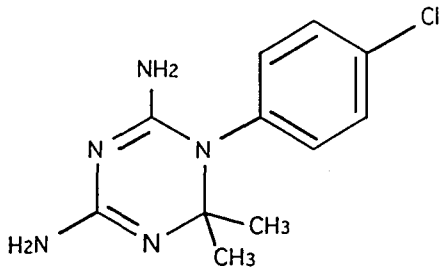
メトトリキセート (Methotrexate)



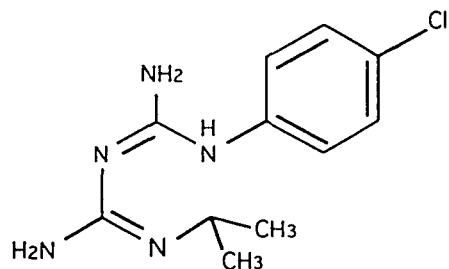
トリメトプリム (Trimethoprim)



ピリメサミン (Pyrimethamine)



シクログアニル (Cycloguanil)



プログアニル (Proguanil)

図-2 熱帯熱マラリアDHFRの活性中心に入りうるリガンドの化学構造
DHFRの基質であるジヒドロ葉酸 (DHF) とその反応物のテトラヒドロ葉酸 (THF)、DHFRの拮抗阻害剤であるメトトリキセート (Methotrexate)、トリメトプリム (Trimethoprim)、ピリメサミン (Pyrimethamine)、シクログアニル (Cycloguanil)、プログアニル (Proguanil)。3種の拮抗阻害剤の化学構造が酷似している。

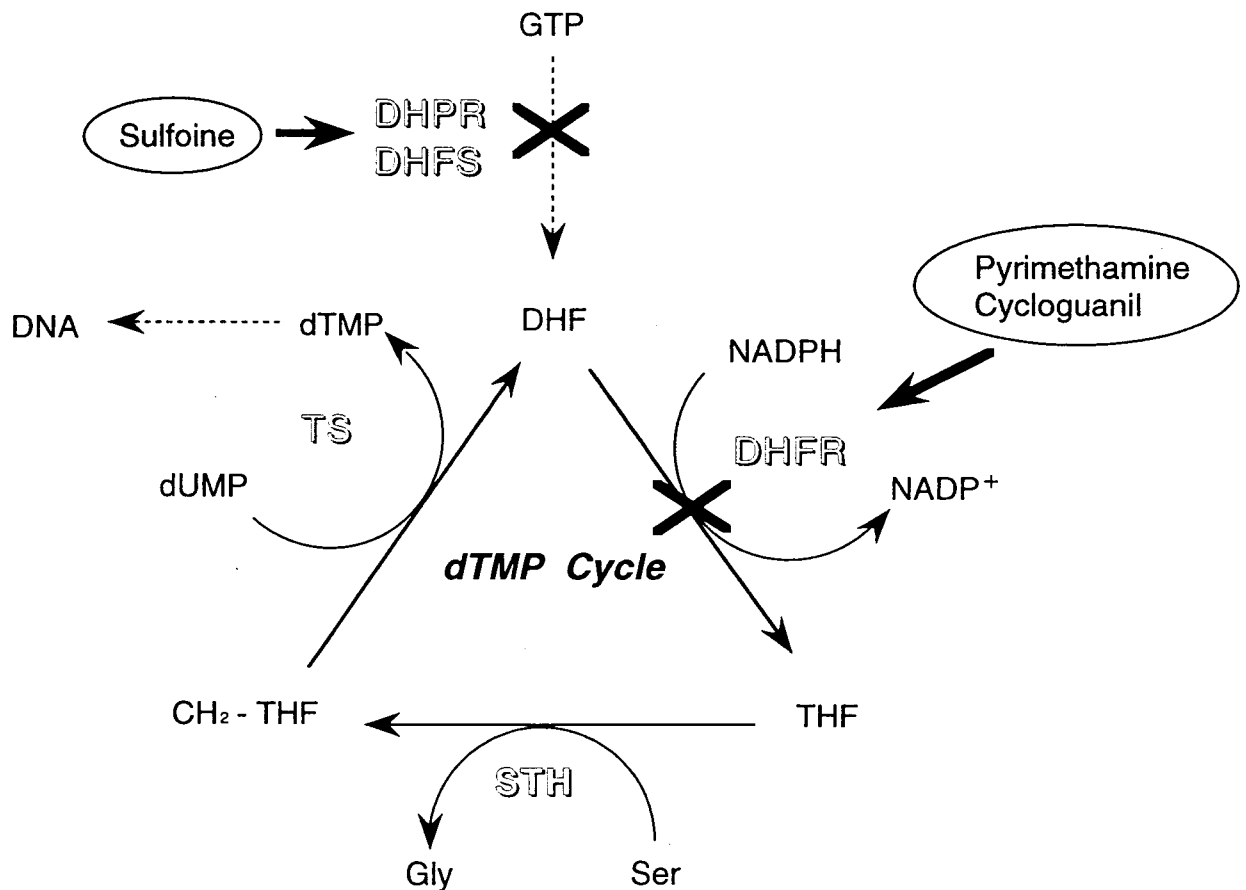


図-3 マラリア原虫における葉酸代謝地図

ジヒドロ葉酸は様々なステップを経てGTPから合成される。ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) はジヒドロ葉酸 (DHF) をテトラヒドロ葉酸 (THF) に還元する。テトラヒドロ葉酸はセリントランスヒドロキシメチラーゼ (STH) によってメチル基を獲得し、チミジル酸合成酵素はそれを用いてdUMPからdTMPを産生する。そのdTMPはDNA合成に用いられる。ピリメサミン (Pyrimethamine)、シクログアニル (Cycloguanil) はDHFRを、サルファ剤 (Sulfoine) はジヒドロプロテイン酸還元酵素 (DHPR) とジヒドロ葉酸合成酵素 (DHFS) を阻害する。

Strain	Origin	Level of drug resistance (μM)		Amino acid residues							Reference
		Pyr	Cyc	16	51	54	59	108	164	223	
Csl-2	Thailand	40	n.t	Ala	Asn	Asp	Arg	Asn	Leu	Phe	1
Dd2	Indochina	25	n.t	Ala	Ile	Asp	Arg	Asn	Ileu	Phe	2
V-1	Vietnam	20	n.t	Ala	Asn	Asp	Arg	Asn	Ileu	Phe	1
K-1	Thailand	20	n.t	Ala	Asn	Asp	Arg	Asn	Ileu	Phe	1,3
7G6	Brazil	12	n.t	Ala	Ile	Asp	Cys	Asn	Ileu	Phe	1,2,4
It.D12	Brazil	4	0.064	Ala	Ile	Asp	Cys	Asn	n.t.	n.t.	2,8
HB3	Hondulas	1.5	0.008	Ala	Asn	Asp	Cys	Asn	Ileu	Phe	1,2,4,8
Hond.-1	Hondulas	R	n.t	Ala	Asn	Asp	Cys	Asn	Ileu	Phe	5
Camp	Malaysia	1.0	n.t	Ala	Asn	Asp	Cys	Asn	n.t.	n.t.	2
Palo Alto	Uganda	0.5	n.t	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ileu	Phe	1
3D7	Netherland	0.025	0.001	Ala	Asn	Asp	Cys	Ser	Ileu	Phe	1,2,4,8
FCR3	Gambia	0.020	0.254	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ileu	Phe	2,4,5,6,8
It.G2 F6	Brazil	0.006	0.254	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	n.t.	n.t.	2,8
SL/D6	Sierra Leone	0.004	0.0002	Ala	Asn	Asp	Cys	Ser	Ileu	Phe	2,8
L.E5	Liberia	0.004	n.t	n.r.	Asn	Asp	Cys	Ser	n.t.	n.t.	6
FC27	Papua-NG	S	n.t	Ala	Asn	Asp	Cys	Ser	Ileu	Phe	6
FAC8	Brazil	S	n.t	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ileu	Phe	6
FCR/3D4-D7	Expl mutants	R	n.t	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ileu	Ser	5
FCR/3D8 (i)	Expl mutants	R	n.t	Val	Asn	Asn	Cys	Thr	Ileu	Ser	5,7
FCR/3D8 (ii)	Expl mutants	R	n.t	Val	Asn	Asp	Cys	Thr	Ileu	Ser	5

(1) Cowman.A.F., *et al* 1988 (2) Peterson.D.S., *et al* 1988

(3) Snewin.V.A., *et al* 1989 (4) Zolg.J.W., *et al* 1989

(5) Tanaka.M., *et al* 1990 (6) Foote.S.J., *et al* 1990

(7) Inselberg.J., *et al* 1988 (8) Peyerson.D.S., *et al* 1990

表 - 1 マラリアDHFRにおける部位特異的変異と薬剤に対する耐性の強さ。薬剤耐性の強さはマラリアを培養している培地に抗マラリア剤を入れ、50%致死濃度:IC50 (μM)で示している。Sは薬剤感受性を、Rは薬剤耐性を示している。n.t: 未測定

害剤と異なった化学構造を持つ阻害剤は、点突然変異によってのみ耐性を獲得する熱帯熱マラリア原虫に対して有効に作用することが期待できる。またDHFRの活性中心に対する結合部位の異なる複数の薬剤を一度に使用する方法は耐性株の出現頻度を抑える上で極めて有効と考えられる。しかしマラリア原虫DHFRを標的とする新薬の開発はこれまであまりなされていない。これはマラリアDHFRは精製標品を大量に調製することが難しい点に起因する。様々な化学構造を持つ何百何千もの候補化合物の一次スクリーニングを行うときに、*in vitro* の系でマラリアDHFRの酵素活性を測定できないため、一次スクリーニングにはマラリア原虫の培養系が必要とされる。ところが熱帯熱マラリア原虫の培養は人間の血液を必要とし、また熟練した技術を持つ研究者を多数要するため莫大な経済的、時間的な負担が要求される。また精製標品を大量に調製することが難しいためにマラリアDHFRは生化学的、物理化学的な解析があまり進んでおらず、他の生物種のようにDHFRの活性中心の立体構造は解明されていない。

これまでマラリア原虫から直接DHFR-TSを調製する試みがなされた(Kan. S.C., and Siddiqui.W.A., 1979, Banya.H.S., and Inselberg.J., 1985, Walter.R.D., 1986, Guo-Xian.C, and Zolg.W., 1987, Zolg.W., *et al* 1989) が、微量のタンパク質しか調製することしかできなかった。一方大腸菌にマラリアDHFR-TSのcDNAを導入し、大量に蛋白を発現させることが試みられたがこれはうまくいかなかった(Sirawaraporn.W., *et al* 1990 Hall.S.J., *et al* 1991 Horii.T., unpublished data)。この理由の一つとして熱帯熱マラリア原虫のDNA組成が約70%の極端なA-T rich(Wada. K., *et al* 1987)であることに注目した。確認されている生物種で最も極端なA-T richのため熱帯熱マラリア原虫と大腸菌ではコドン使用頻度が著しく異なり、大腸菌において使用頻度の低いコドンを多用したことがマラリア遺伝子の発現に影響を及ぼしたと考えた。

我々は大腸菌において熱帯熱マラリア原虫のDHFR部分を効率良く発現させるため、マラリアDHFRの各アミノ酸のコドン使用頻度とその配列を大腸菌DHFR型に変えた人工遺伝子を合成DNAを用いて再構築した。これを発現ベクターにつなぎ大腸菌に導入し、大量の蛋白の発現、精製に成功し、生化学的な解析を行った(第一章)。さらに構築した薬剤感受性型のマラリアDHFR遺伝子に点突然変異を導入し、4種類の薬剤耐性型DHFR遺伝子を作成した。薬剤耐性型マラリアDHFRを大量に調製し、抗マラリア剤に対する親和性を調べ、同じ耐性型DHFRを持つ薬剤耐性原虫株に対する増殖阻害効果と比較した(第二章)。第三章では構築した熱帯熱マラリアDHFRの*in vitro* 反応系を用いて約120種類の化合物をスクリーニングし、マラリアDHFRを選択的に阻害する化合物を選び出し、その化合物をマラリア原虫の培養系に加え、増殖阻害の効果を測定した。

目次

謝辞	i
要旨	ii
序論	iii
目次	x
第1章	
薬剤感受性型熱帯熱マラリア原虫DHFR遺伝子の 構築と生化学的解析	1
要旨	2
序論	3
材料と方法	6
菌株と培地	6
熱帯熱マラリアDHFR遺伝子の構築	6
熱帯熱マラリアDHFR遺伝子の伸張	9
レコンビナントDHFRの誘発	13
レコンビナントDHFRの精製	13
DHFR酵素活性の測定	14
結果	17
熱帯熱マラリアDHFR遺伝子の設計	17
熱帯熱マラリアDHFRの大腸菌における発現	17
レコンビナントDHFRの再活性化	24
レコンビナントDHFRの単離精製	28
最終分画における活性の検討	28
DHFRの反応条件依存性と酵素学的定数	31
マラリアDHFR遺伝子の伸張	31
DHFR遺伝子の誘発	41
DHFR遺伝子の生化学的解析	41
考察	45
参考文献	47
第2章	
薬剤耐性型マラリアDHFRの生化学的解析	52
要旨	53
序論	54
材料と方法	57
菌株と培地	57
薬剤耐性型DHFR遺伝子の構築	57

熱帯熱マラリアDHFRの誘発-----	58
レコンビナントDHFRの精製-----	58
薬剤耐性型熱帯熱マラリアDHFRの活性測定-----	58
マラリア原虫の培養と増殖阻害実験-----	58
結果-----	60
薬剤耐性型マラリアDHFR遺伝子の構築、 ならびに蛋白の発現と単離精製-----	60
薬剤耐性型熱帯熱マラリアDHFRの生化学的解析-----	60
熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害実験-----	61
考察-----	70
参考文献-----	72

第3章

pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体のスクリーニング-----	77
要旨-----	78
序論-----	79
材料と方法-----	83
菌株と培地-----	83
薬剤耐性型マラリアDHFRの誘発と精製-----	83
Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体-----	83
化合物の熱帯熱マラリアDHFRに対する阻害効果の測定-----	83
マラリア原虫の培養と増殖阻害実験-----	83
結果-----	87
Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体のスクリーニング-----	87
薬剤耐性型マラリアDHFRに対する Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の阻害効果-----	87
熱帯熱マラリア原虫に対する Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の増殖阻害効果-----	92
考察-----	97
参考文献-----	100

第一章

薬剤感受性型熱帯熱マalaria DHFR 遺伝子の 構築と生化学的解析

要旨

熱帯熱マラリアDHFRの生化学的な解析を可能にするためマラリアDHFRを大腸菌を用いて大量に調製する系を構築した。マラリアDHFRはチミジル酸合成酵素(TS)と一本のポリペプチド上に存在するのでDHFR部分と考えられる227個のアミノ酸をコードするような遺伝子を設計した。大腸菌における大量発現を可能にすべく熱帯熱マラリアDHFRのコドン使用頻度を大腸菌型に換えた人工遺伝子を合成DNAを用いて再構築した。再構築したマラリアDHFR遺伝子を発現ベクターに挿入し、大腸菌において誘発したところ、全蛋白質の約30%程発現したが、その大部分は重合状態にあり細胞破壊後にはDHFR活性はほとんど検出されなかった。その後、グアニジン塩酸塩で重合状態あったレコンビナントDHFRを可溶化し、リン酸bufferで20倍に薄めることによって再活性化した。再活性化させたレコンビナントDHFRはヒドロキシアパタイトカラムとS-300ゲルフィルトレーションによって精製した。この系によって一回の精製で約98%の最終標品が約10mg得られ、N末端のアミノ酸配列が設計したマラリアDHFRのものと一致することはペプチドシーケンサーによって確認した。またほとんど全てのレコンビナントDHFRが活性を持っていることを阻害剤による滴定によって確認した。精製したマラリアDHFRの酵素活性を測定したところ、マラリア原虫より直接調製されたDHFR-TSの示す、酵素活性のパラメーターに、必ずしも近似した値を示さなかった。一方N、C両末端を様々に変化させたDHFR遺伝子を12種類構築し、これらを用いて酵素活性を測定したところ、231個のアミノ酸によって構成されるマラリアDHFRは原虫より直接調製したDHFR-TSに非常に近い値を示した。

序論

マラリアの起因病原体は *Plasmodium* 属の原生動物で、ハマダラ蚊を介して人に感染する。今世紀に入り強力なマラリア対策が推進されが、その成果は挙がらず、最近ではむしろ患者数の増加傾向が見られている。その理由の一つとして、薬剤耐性株の問題がある。クロロキン (chloroquine) や ピリメサミン (pyrimethamin) の薬剤耐性株はほとんど全発生地に拡大し、化学療法が盛んに行われる都市近郊地域では多剤耐性株も問題となっている。最近では新たにメフロキン (mefloquine) や チンハオスー (qinghaosu) などの抗マラリア剤が開発されたが、これによって薬剤耐性株の問題が解決するとは考えられない。そのため新しい抗マラリア剤の開発が必要であり、そのためにはこれまでにマラリア原虫が獲得してきた薬剤耐性機構の解明が急務の課題である。

抗マラリア剤として現在も使用されているピリメサミンやプロゲアニル (図 - 2) はマラリア原虫の DHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) を標的にしているが、多くの抗マラリア剤のうちこれらの薬剤だけが標的の解っている薬剤である。ほとんどの生物種において、DHFR (EC.1.5.1.3) と TS (EC.2.1.1.45) (チミジル酸合成酵素) (図 - 3) はそれぞれ独立した酵素として働いているが、マラリア原虫などの原生動物においてはこの二つの酵素が約 55 - 70 kDa の一本のポリペプチド上に存在し、junction 部分を介し DHFR の C 末に TS の N 末がつながっている (Bzik.D.J., et al 1987)。

一般に生物が薬剤に対し耐性を持つ機構は薬剤に対する分解または修飾による不活性化、薬剤の標的の量的、質的变化、細胞膜における透過性の変化に大別される。DHFR 阻害剤に耐性を持つ原虫類の解析は特に進んでおり、*Ctichidia fascichidia* や *Leishmania tropica* などはメトトリキセートに対しほ乳動物の癌細胞と同じように遺伝子増幅によって耐性を獲得し (Frone. R., et al 1980, Coderre.J.A., et al 1983, Meed.T.D., et al 1985)、*Leishmania amazonensis* は DHFR - TS とは別に NADPH 分解酵素と良く似た一次構造を持つ酵素が発見し、その結果メトトリキセートに耐性を持つ (Papadopoulou.B., et al 1992) ことが分かっている。マラリア原虫では齧歯類に感染する *P. chabaudi* は DHFR 阻害剤に対する親和度の低い DHFR - TS を発現させることが知られている (Sirawaraporn.W., and Yuthavong.Y., 1984)。熱帯熱マラリア原虫では世界各地の流行地域より単離された DHFR 阻害剤に対する耐性を獲得した株と薬剤感受性株の解析により、耐性株は DHFR - TS 遺伝子の DHFR 部分の特定の位置に点突然変異を持っている事が明らかになった (Cowman.A.F., et al 1988, Peterson.D.S., et al 1988, Snewin.V.A., et al 1989, Zolg.J.W., et al 1989, Foote.S.J., et al 1990, Inselburg.J., et al 1988, Peterson.D.S., et al 1990)。遺伝子解析された耐性株は薬剤に対する耐性の強さも培養系によって調べられ、点突然変異の数が増えるほど薬剤に対する耐性

が向上する傾向が示された(表-1)。以上の知見より熱帯熱マラリア原虫がDHFR阻害剤に対して獲得した耐性の機構は標的酵素上に起こった点突然変異に起因するものと考えられている。

これまでに生化学的な解析を行うためマラリア原虫から直接DHFR-TSを調製する試みがなされた(Kan.S.C., and Siddiqui.W.A., 1979, Banyal.H.S., and Inselberg.J., 1985, Walter.R.D., 1986, Guo-Xian.C, and Zolg.W., 1987, Zolg.W., *et al* 1989)が、ごく微量の酵素しか精製できなかった。それは熱帯熱マラリア原虫はその複雑な生活環において赤血球による培養しか成功しておらず、大量培養が極めて困難なことからマラリア原虫より直接大量のタンパク質を調製することは困難であることに起因する。マラリア原虫のDHFR-TSを大量に調製できれば新しい抗マラリア剤の開発が非常に効率よく行えるようになる。それは何百何千もの候補化合物のスクリーニングを*in vitro*の系で行えることだけにとどまらず、X線結晶解析で得られた立体構造の情報をもとにコンピューターによるドラッグデザインが可能になる。そのためこれまで大腸菌にマラリアDHFR-TSのcDNAを導入し、大量に蛋白を発現させることが試みられたがこれはうまくいかなかった(Sirawaraporn.W., *et al* 1990, Hall.S.J., *et al* 1991, Horii.T., 未発表)。この理由の一つとして熱帯熱マラリア原虫の遺伝子が約70%の極端なA-T rich(Wada.K., *et al* 1992)であり、そのため熱帯熱マラリア原虫と大腸菌ではコドン使用頻度が著しく異なることが挙げられる(表1-1)。

コドン使用頻度の異なる蛋白を大量発現させる方法の一つに合成DNAを用いて遺伝子を再構築させる方法がある。Itakuraらが207塩基対の大腸菌チロシンリプレッサー tRNA 前駆体の遺伝子を構築し、バクテリオファージ λ に組み込み、大腸菌を形質変換させることに成功した(Itakura.K., *et al* 1977)のが微生物中での合成遺伝子の発現を確認した最初の例である。その後分子量のより大きな蛋白質の遺伝子も同様の方法で合成されるようになった。代表的なものヒトインシュリン(Crea.R., *et al* 1978)、ヒトインターフェロン(Edge.M.D., *et al* 1981)等の遺伝子が合成され、大腸菌内で効率よく発現されることが示された(新生化学実験講座 タンパク質VII §7.1)。私は大腸菌において熱帯熱マラリア原虫のDHFR部分を効率良く発現させるため、マラリアDHFRのコドン使用頻度を大腸菌DHFR型に変えた人工遺伝子を構築し、これを用いて大量の蛋白を精製し、さらにその生化学的な解析を行った。

Phe TTT TTC	Ser AGT AGC TCT TCC ● TCA ● TCG ○	Tyr TAT ○ TAC	Cys TGT ● TGC ●
Leu TTA ○ TTG CTT CTC CTA ● CTG ○	Pro CCT ● CCC ● CCA ○ CCG ○	His CAT CAC	Trp TGG
Ile ATT ○ ATC ○ ATA ●	Thr ACT ACC ACA ● ACG ○	Gln CAA ○ CAG ○	Arg CGT CGC ○ CGA ● CGG ● AGA ● AGG ○
Met ATG	Ala GCT GCC GCA ○ GCG ○	Asn AAT ○ AAC	Gly GGT ○ GGC ○ GGA ○ GGG ○
Val GTT GTC GTA GTG		Lys AAA ○ AAG	
		Asp GAT ○ GAC	
		Glu GAA ○ GAG	

- High frequency for *E. coli*
- Low frequency for *E. coli*
- High frequency for *P. falciparum*
- ◐ Low frequency for *P. falciparum*

表 1-1 大腸菌と熱帯熱マラリアとのコドン使用頻度の比較

大腸菌において高頻度で使用されているコドンは白丸で、大腸菌において低頻度で使用されているコドンは黒丸で、熱帯熱マラリア原虫において高頻度で使用されているコドンは白楕円で、熱帯熱マラリア原虫において低頻度で使用されているコドンは網掛け楕円で、それぞれ示す (Wada.K., et al 1992)。

材料と方法

菌株と培地

本研究で使用した大腸菌は、合成遺伝子のクローニングと再構築用にはTG-1株とJM 103株 (Messing.J., *et al* 1983) を使用した。またJM 103株はpKM-2ファージの調製にも使用した。レコンビナントDHFR蛋白質の発現にはJM 103株とBL21(DE-3) Lys-S (Studier.F.W., *et al* 1990) を使用した。バクテリオファージは合成遺伝子のクローニングとDNAの塩基配列の決定にM13-mp18 (Perron.Y., *et al* 1985) とM13-mp19 (Norrander.J., *et al* 1983) を使用した。またレコンビナントDHFRの発現にはM13-pKM2 (Morimatsu.K., *et al* 1994) を使用した。プラスミドはpBluescript KS+ (STRATAGENE) を遺伝子構築用にし、pET-3a (Studier.F.W., *et al* 1990) をレコンビナントDHFRの発現用を使用した。大腸菌の培養にはL-brothとTerrific-broth (Tartof.K.D., and Hodds.C.A., 1987) を使用した。またJM 103株のF因子の選択培地としてDavis minimal-broth を使用した。

熱帯熱マラリアDHFR遺伝子の構築

マラリアDHFR遺伝子の構築に使用した合成DNAの塩基配列は図1-1に示されている。遺伝子の構築に用いたssDNAの合成はPharmacia LKB Gene Assembler Plusによって行われ、ssDNAのA-1, A-2, E-1からE-5は μ -Bondasphere-C18-5 μ -100Å-19x150nm column (Waters) によって、それ以外のssDNAは20%ポリアクリルアミドゲルによって精製した。精製したssDNAはZYMOSTAT AB-1250 (ATTO) を使ってアニーリングした。アニーリング反応は50 μ lのbufferで行われた。bufferの組成は(0.5 μ g of each DNA, 0.1M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.6, 1mM DTT, 0.1mM EDTA) である。

アニーリング反応は以下の温度条件で行った。

95℃ 5min → 80℃ 60min → 75℃ 60min → 70℃ 60min → 65℃ 60min
→ (60℃ 60min → 55℃ 60min → 50℃ 60min → 45℃ 60min) → 5℃
90min () 内は3回行い、各温度変化は3分で行う。

PCR反応における T_m は

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log (Na^+) + 0.41 (G+C\%) - 60L :$$

(Na^+):モル濃度, L: アニールさせるDNAの長さ

に基いて (E.T. Bolton, and B.J. McCarthy. 1962) 求めた。実際にアニールさせるときは20℃程温度を下げるので58.9℃とした。アニールさせた後エタノール沈澱させ、高塩濃度のbuffer (0.1M NaCl) に溶かした後アクリルアミドゲルによって目的の分子量の部分を切り出し、ベクターにクローニングした。

A - 1

5'- TATGGAGCAGGTATGTGACGTTTTTCGACATCTACGCGATTTGCGCGTGCT
GCAAGGTGGAGTCAAAGAACGAGGGAAAAAAAAAATGAGGTGTTCAACAAC
TACACATTTTCGAGGCCTTGGTACCG -3'

A - 2

5'- GATCCGGTACCAAGGCCTCGAAATGTGTAGTTGTGTTGAACACCTCATTTTT
TTTTCCCTCGTTCTTTGACTCCACCTTGCAGCACACGCAAATCGCGTAGA
TGTCGAAAACGTACATACCTGCTCCA-3'

B - 1

5'- GATCCAGTACTTCATATCCAATGAGTTGCATTTCCACGGCAACACACCTT
TGTTGCCAMAGGCCTA-3'

B - 2

5'- AGCTTAGGCCTTGGCAACAAAGGTGTGTTGCCGTGGAAATGCATCTCATT
GGATATGAAGTACTG-3'

B - 3

5'-AGCTTAGGCCTTGGCAACAMAAGGTGTGTTGCCGTGGAAATGCAACTCAT
TGAATATGAAGTACTG-3'

C - 1

5'- GTTTTTTAGAGTTAGGCATATCATTGACGTTGTCAACTGTTTCTTTGTTG
AGATACTTACACCGCTTATACTTAAGTTTTTCGTATTTACTTTTCATTCAC
ATACGTGGTCACTGCACGAAAGTACTA-3'

C - 2

5'- AGCTTAGTACTTTTTGTGCAGTGACCACGTATGTGAATGAAAGTAAATACG
AAAACTTAAGTATAAGCGGTGTAAGTATCTCAACAAMAGAAACAGTTGAC
AACTGCAATGATATGCCTAACTCTAAAAAACTGCA-3'

D - 1

5'- TCCTCTTCTTCAACGTTCTAGAGAGGATCACATTGATGCGATTTCGACAA
CGGCTTGAMATTTTTTCGGGATTGATCCCAGTTCGTGCGGCCATAACAA
CGACGTTCTGCA-3'

図 1 - 1 合成DNAの塩基配列 (1)

D - 2

5'- CGTTGTCGAATCGCATCAATGTGATCCTCTCTAGAACGTTGAAGAAAGAG
GACTTTGACGAAGATGTATATATTATTAATAAGGTGGAAGATTTGATCGT
GCTCCTAGGTAC-3'

D - 3

5'-GAACGTCGTTGTTATGGGCCGCACGAGCTGGAATCAATCCCGAAAAAAT
TCAAGC-3'

D - 4

5'-GAACGTCGTTGTTATGGGCCGCACGACCTGGAATCAATCCCGAAAAAAT
TCAAGC-3'

D - 5

5'- CTAGGAGCAGGATCAAATCTCCACCTTATTAATAATATATACATCTTCG
TCAAAG-3'

E - 1

5'- AATTCCTAGGTAAGTTGAATTACTACAAATGCTTTATTATTGGCGGCAGC
GTTGTTTATCAGGAATTTTGGAGAAGAAGCTGATCAAGAAGATCTACTT
TACGCGTATCAATAGCACCTATG-3'

E - 2

5'- AATGTGACGTGTT
TTCCCGAAATTAATGAGAACGAGTACCAGATAATC
TCCGTCAGCGACGTCTACACCTCTAACAACACTACTTTGGACTTTATTAT
TTATAAGAAGTAAG-3'

E - 3

5'- GATTATCTGGTACTCGTTCTCATTAAATTTCCGGGAAGAACACGTCACATT
CATAGGTGCTATTGATACGC - GTAAMAGTAGATCTTCTTGATCAGCTTCT-3'

E - 4

5'-
TCTCCAAAAATTCCTGATAAACAACGCTGCCGCCAAGAATAAAGCATTG
TAGTAMATTCAACTTACCTAGG-3'

E - 5

5'- GATCCTTACTTCTTATAAATAATAGAGTCCAAAGTAGTGTTGTTAGAGGT
GTAGACGTCGCTGACGGA-3'

図 1 - 1 合成DNAの塩基配列 (2)

5つのユニットに分けて作ったDHFR(図1-2)は以下のように構築した。

- 1: アニールさせた後5つのユニットはそれぞれベクターにクローニングした。A-unitはpET-3aに、B-EユニットはM-13 mp18, mp19にそれぞれクローニングした。DNA sequencingによって設計した塩基配列がベクターにクローニングされていることを確かめる。
- 2: B-unitのクローニングされているM-13とC-unitのクローニングされているM-13 mp18をScaIとBglIIで切り、B-C unitをつなぐ。
- 3: D-unitのクローニングされているM-13と1のM-13をPstIとKpnIで切り、B, C, Dユニットをつなぐ。
- 4: B-DユニットのクローニングされているM-13をStuIとKpnIで切り、A-unitのクローニングされているpET-3aに挿入する。
- 5: A-DユニットのクローニングされているpET-3aとE-unitのクローニングされているM-13をAvrII(BlnI)とKpnIで切り、A-EユニットをpET-3a上でつなぐ。これで発現ベクターが完成したことになる(図1-3)。

熱帯熱マラリアDHFR遺伝子の伸張

構築したマラリアDHFR遺伝子のN末端とC末端を伸張する際にはPCR法を用いた。用いたプライマーであるN-1, C-1~C-5の塩基配列は図1-4に記す。プライマーN-1, C-1~C-5は図1-6に示してあるようにtemplateであるマラリアDHFR遺伝子に結合する。DHFR231の作製時にはN-1, C-1プライマーを使用した。同様にDHFR241にはN-2, C-2を、DHFR280にはN-3, C-3を、DHFR289にはN-3, C-4を、DHFR321にはN-3, C-5を、それぞれ用いてDNAを増幅した。PCR反応に用いたbuffer組成は以下の通り。template DNA: 100 ng, N-xプライマー: 300ng, C-xプライマー: 300ng, KCl: 10mM, Tris-HCl pH8.8 at 25℃: 20mM, (NH₄)₂SO₄: 10mM, MgSO₄: 2mM, Triton X-100: 0.1%, dNTPs: 500μM。増幅されたDNAはDHFR231の場合はEcoRI, BamHIを用いてpBluescript KS+にクローニングした。同様にDHFR241はXbaI, BamHIを、DHFR280, 289, 321はPstI, BamHIをそれぞれ用いてpBluescript KS+にクローニングした。その塩基配列をそれぞれのDNAについてジデオキシ法で確認した後、DHFR231の場合はNdeI, BamHIを用いてpET-3aにクローニングした。同様にDHFR241はXbaI, BamHIを、DHFR280, 289, 321はPstI, BamHIをそれぞれ用いてpET-3aDHFRにクローニングした。DHFR230, 240, 279, 288, 230遺伝子の作成はDHFR227遺伝子のNdeI, XbaI断片をpET-3aDHFR231, 241, 280, 289, 231遺伝子のNdeI, XbaI部位に挿入した。

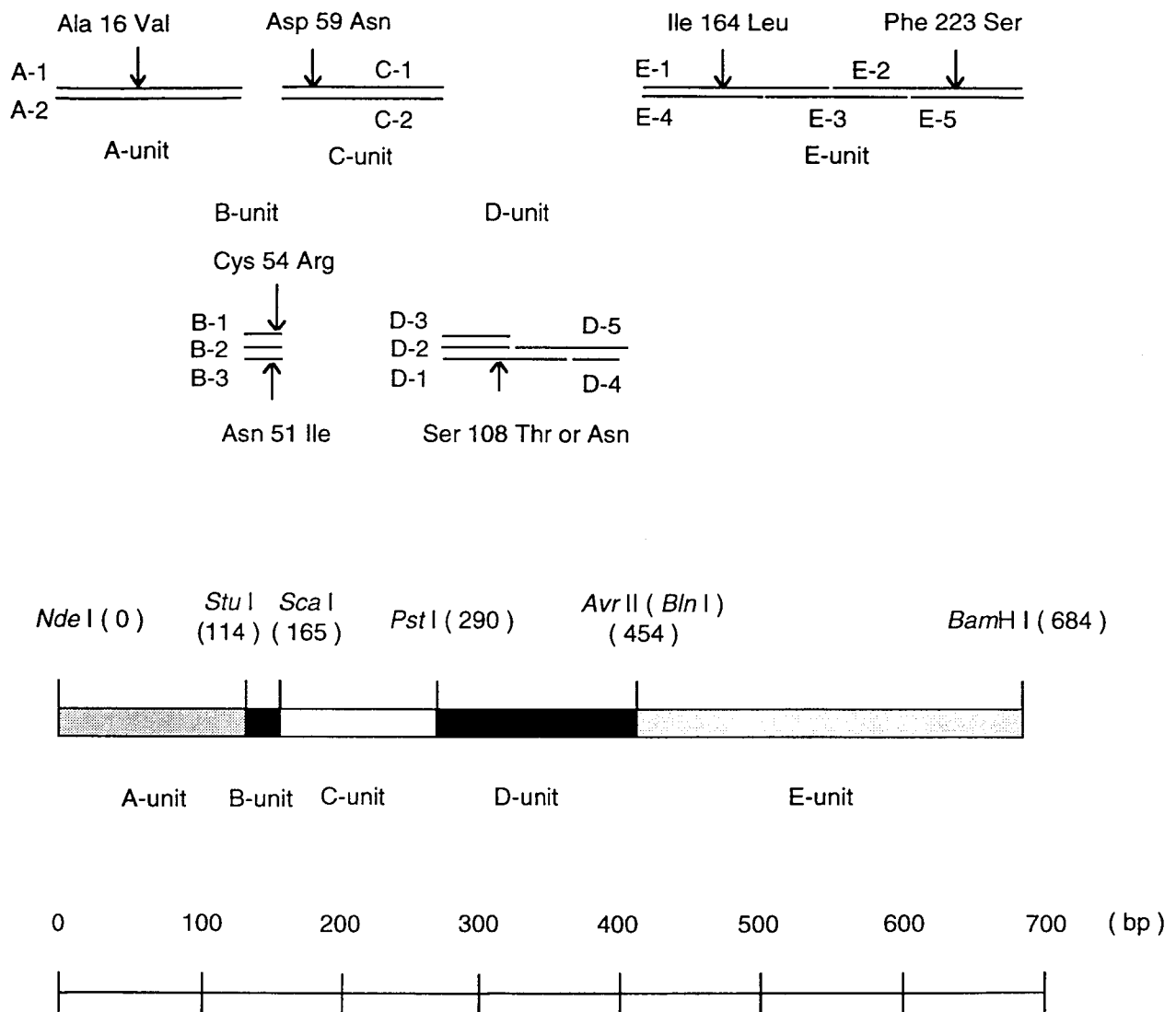


図 1-2 熱帯熱マラリアDHFR遺伝子遺伝子の再構築

マラリアDHFR遺伝子の再構築に用いられる合成DNAは一方のssDNAには薬剤感受性型遺伝子の塩基配列が、それに相補なもう一方のssDNAには薬剤耐性型遺伝子の塩基配列が使われた。塩基配列を確認された後に各ユニットの両端に存在する制限酵素を用いてマラリア遺伝子が構築された。

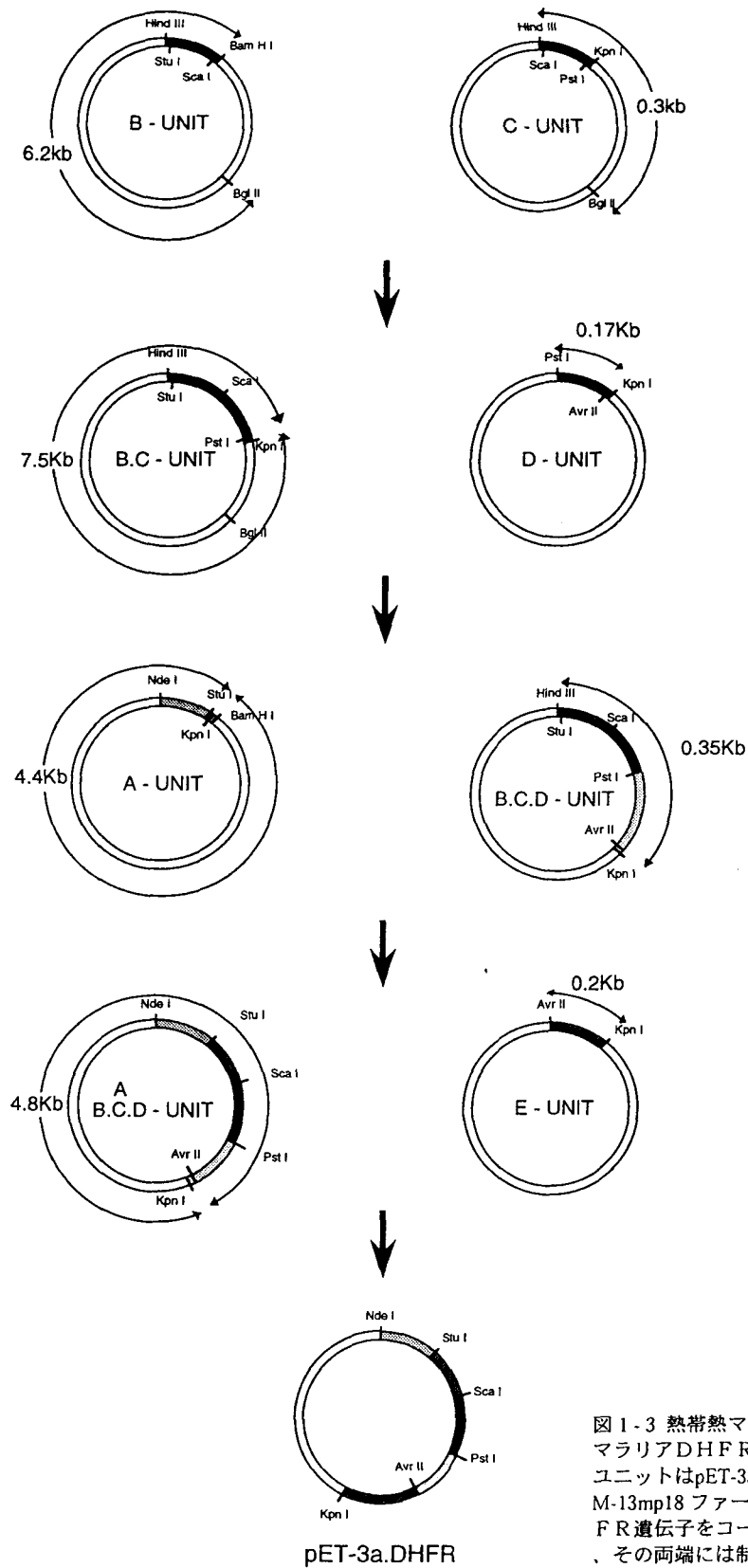
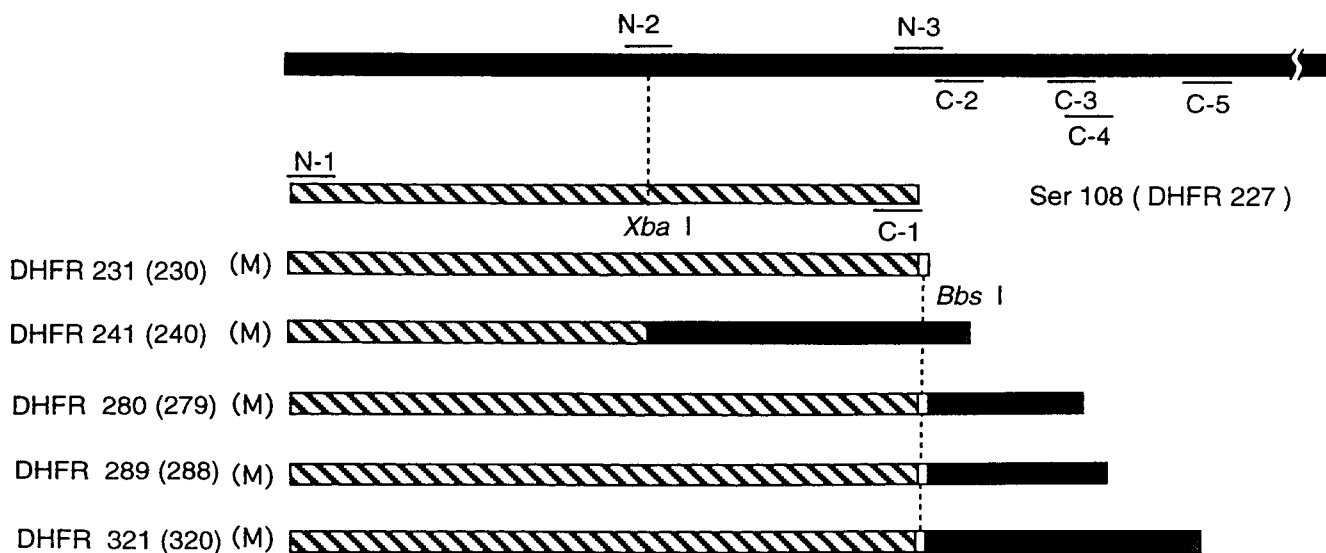


図 1-3 熱帯熱マラリアDHFR遺伝子の作製順序
 マラリアDHFRは5つのユニットより構築された。A-
 ユニットはpET-3aベクターに、その他のユニットは
 M-13mp18ファージにクローニングされた。マラリアDH
 FR遺伝子をコードしている部分には網掛けがされてお
 り、その両端には制限酵素部位が示されている。

cDNA of *P.f.* DHFR-TS FCR 3



N-1
 5' -CGCGAATTCATATGATGGAGCAGGTATGTGAC-3'
 N-2
 5' -GGGAAAGCATTCCAAAAAAA-3'
 N-3
 5' -GCGCTGCAGAAGACGAATAATAAAATGTTA-3'
 C-1
 5' -CGCGGATCCTTAATTATTCGTCTTCTTATAAAATAATAAA-3'
 C-2
 5' -CGCGGATCCTTATTTTATACAATTTTGTTC-3'
 C-3
 5' -CGCGGATCCTTAATTTTCATAATTAATTTT-3'
 C-4
 5' -CGCGGATCCTTAATCATCTTCTTCTTCATC-3'
 C-5
 5' -CGCGGATCCTTAATATTTTATATTTCAAGCT-3'

図1-4 熱帯熱マラリアDHFR遺伝子伸長反応の概要と用いられたプライマー
 DHFR 231はN-1,C-1プライマーを用いて作製した。C-1プライマーの3'末端に制限酵素*Bbs* Iがある。DHFR 240のN末端はN-2,C-2プライマーを用いて作製した。制限酵素*Xba* Iを用いてレコンビナントDHFRのC末端につないだ。DHFR 280,289,321のN末端はN-3,C-3,4,5プライマーを用いて作製した。*Bbs* Iを用いてレコンビナントDHFRのC末端につないだ。斜線の部分は構築したレコンビナントマラリアDHFRの塩基配列を、網掛けの部分はマラリアのcDNA由来の塩基配列を示す。

レコンビナントDHFRの誘発

熱帯熱マラリアDHFR227遺伝子の入ったプラスミド pET-3a DHFRを大腸菌 JM 103 に入れ、アンピシリンの入ったL-プレートで選択した。これを1.5 l ずつ4本に分けたL-培地 6L に15 ml ずつ加えた。これを37℃で2時間半ほど震とう培養し、 1×10^8 cells/ml まで増殖させた。ここで pKM-2 のフェージ液を $moi = 20$ になるように又、IPTG を50 μ g/ml になるように加え、2時間震とう培養した。震とう培養の後、8000 rpmで20分遠心して菌体を集めた。遠心は4℃で行った。6 l の culture から約20 g の菌体が取れた。集めた菌体は-80℃で保存した。

マラリア DHFR 228,230,231,240,241,279,280,288,289,230,231 遺伝子は大腸菌 BL21(DE-3) Lys-S (F.W. Studier., *et al* 1990) を用いて誘発させた。マラリアDHFR遺伝子を持つ pET-3a プラスミドをカルシウム法によって大腸菌 BL21(DE-3) Lys-S に導入し、アンピシリン、クロラムフェニコールを含むL-プレートで選択した。この大腸菌を1.5 L ずつ4本に分けたLB培地6Lにおいて37℃で2時間半ほど震とう培養し、 1×10^8 cells/ml まで増殖させた。そこでIPTGを終濃度で50 mg/ml になるように加え、以後2時間震とう培養した。その後8000 rpmで20分遠心して菌体を集めた。遠心は4℃で行った。6Lの培地から約10gの菌体が取れた。集めた菌体は-80℃で保存した。

レコンビナントDHFRの精製

DHFR精製に使用したbuffer類は以下に示すとうりである。

Sucrose buffer: 50mM Tris HCl pH7.6, 5mM EDTA, 10mM

2-Mercaptoethanol, 25% Sucrose.,

塩酸グアニジン buffer: 4M グアニジン塩酸塩, 20mM 燐酸 buffer pH 7.0,

1mM EDTA, 10mM 2-Mercaptoethanol, 50mM NaCl.,

燐酸buffer: 20mM 燐酸 buffer: pH 7.0, 10mM 2-Mercaptoethanol, 10%

Glycerol

0.15M P-buffer: 150mM 燐酸 buffer pH 7.0, 10% Glycerol, 10mM

2-Mercaptoethanol

0.4M P-buffer: 400mM 燐酸 buffer pH 7.0, 10% Glycerol, 10mM

2-Mercaptoethanol

90% saturated (Am)2SO4 buffer: 50mM 燐酸 buffer pH 7.0, 1mM EDTA,

10mM 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 3.5M

(NH4)2SO4

S-300 buffer: 50mM 燐酸 buffer pH 7.0, 1mM EDTA, 10mM

2-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 400mM (NH4)2SO4

Stock buffer: 50mM 燐酸 buffer pH 7.0, 1mM EDTA, 10mM

2-Mercaptoethanol, 10% Glycerol, 400mM(NH4)2SO4

以下の精製は A=280 の吸光度を指標に精製し、操作は特に記さない限り 4℃で行った。薬剤耐性型レコンビナント DHFR を誘発させた菌体 7-10 g を Sucrose buffer に懸濁し、10 mg/ml の Lysozyme を 0.5 ml 加えた。その後液体窒素で一度完全に凍結させてから、室温でこれを溶解させた。超音波処理を行い、菌体を完全に破壊したことを顕微鏡で確認した後に 10,000 rpm で 20 分遠心し、沈澱分画を回収した。これを 320 ml の塩酸グアニジン buffer に溶解させ、10,000 rpm で 20 分遠心し、上清を回収した。これを 7680 ml の燐酸 buffer で 2 時間で 25 倍に薄め、8000 rpm で 20 分遠心した後 0.15 M 燐酸 buffer で平衡化した $\phi = 6.0 \times 5$ (cm) のカラムに入った 150 ml のヒドロキシアパタイトカラムに吸着させた。カラムの流速は約 11 ml/min。0.15 M 燐酸 buffer で洗浄した後、0.4 M 燐酸 buffer で薬剤耐性型レコンビナント DHFR を溶出、10 ml ずつ分取し、各分画の A=280 を測定し、ピークのみを回集した。回集した分画を 90% saturated (Am)₂SO₄ buffer によって沈澱させた。10000 rpm で 10 分遠心し、S-300 buffer 3 ml に溶解させた。これを 1500 ml の S-300 buffer によって平衡化した $\phi = 2.5 \times 90$ (cm) の Sephacril S-300 カラムにかけ、分子量 35-10 K Da 付近の分画を分集した (図-5)。この分画を 90% saturated (Am)₂SO₄ buffer によって沈澱させた。10,000 rpm で 10 分遠心し、Stock buffer 3 ml に懸濁し、-20℃で保存した。

DHFR 酵素活性の測定

DHFR の活性はその基質である DHF と NADPH が THF と NADP⁺ に変化する時 (図-3) に変化する、340 nm における吸光の減少によって測定した。DHF と NADPH は化学量論的に 1:1 で反応が起こり、吸光係数: $\epsilon_{340} = 12300 \text{ M} \times \text{cm}$ として計算した (Hillcoat, B.L., et al 1967)。酵素の活性単位; unit としては 1 分間に 1 nM の DHF と NADPH をそれぞれ反応させる酵素活性と定義した。K_m はラインウエーバーバルクプロットによって求め、K_{cat} はラインウエーバーバルクプロットによって求めた最大速度: V_{max} と吸光度計によって測定した酵素濃度によって求めた。IC₅₀ は薬剤濃度と反応速度を片対数プロットにあてはめ、反応速度が半分になる濃度として決定した。レコンビナント DHFR227 の DHF と NADPH に対するミカエリス定数: K_m を求めるときは反応条件 (1) で、反応に用いる DHF、または NADPH の濃度を 100-15 μM に、レコンビナント DHFR228, 230, 231, 288 について K_m を求めるときは反応条件 (2) で、DHF、または NADPH の濃度を 300-15 μM に変化してそれぞれの濃度における反応速度を計算した。反応速度とその時の基質の濃度をもとに Lineweaver-Burk プロットによって K_m を決定した。

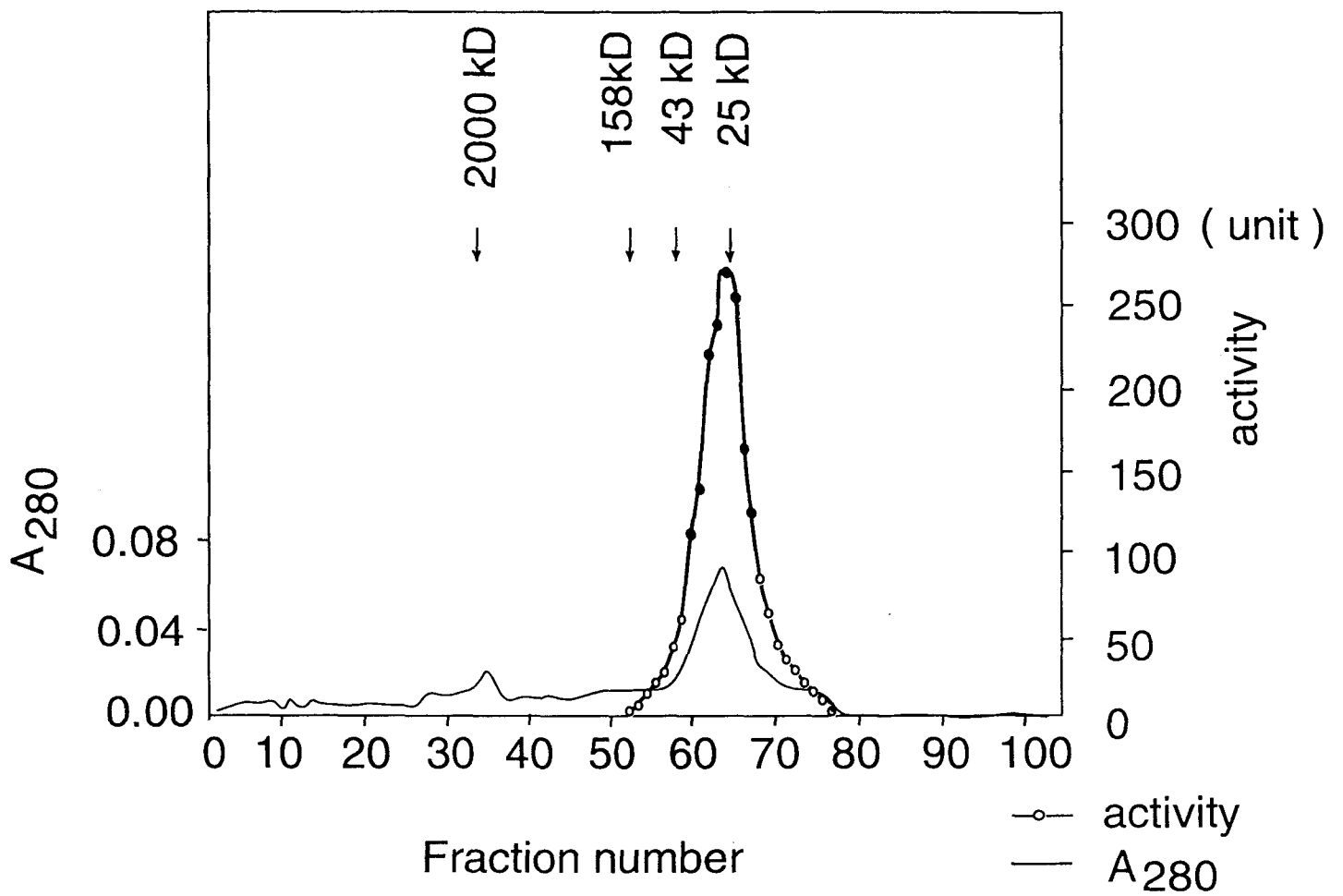


図 1 - 5 S-300 ゲルフィルトレーションの溶出
 o の付いた実線はDHFRの酵素活性を、実線のみは
 A=280 nm の吸光で測定した蛋白の量を示す。上の矢印は 4
 つの分子量マーカーの出るフラクション番号を示す。

反応条件 (1) : 50mM Tris HCl pH 7.6, 1mM EDTA, 70mM

2-mercaptoethanol, 100 mg /ml BSA, 100 μ M NADPH, 100 μ M DHF and *P.f.*DHFR .,

反応条件 (2) : 50mM Tris HCl pH 7.6, 1mM EDTA, 70mM

2-mercaptoethanol, 100 mg /ml BSA, 300 μ M NADPH, 300 μ M DHF and *P.f.*DHFR .,

反応は総量 200 μ l の反応液を light path = 2mm のキュベットに入れ、340 nm の吸光度の減少を測定した。DHF 以外の反応液 196 μ l をあらかじめ 37 $^{\circ}$ C で 2 分間保温した後 4 μ l の DHF を加えることで反応を開始させた。変化する吸光度を測定し、1 分間あたりに変化する吸光度を測定することによって反応速度を測定した。

反応系における塩酸グアニジンの影響を測定したときには反応系に終濃度が 0, 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.40 M になるように塩酸グアニジンを加えた。DHFR 活性の pH による影響を測定したときには反応液中の buffer を以下のように変えた。pH 4.0 と pH 5.0 での測定時は各 pH の 50 mM 酢酸ナトリウムを使用した。pH 6.0 と pH 7.0 での測定時は各 pH の 20 mM の燐酸 buffer を使用した。DHFR 活性の温度による影響を測定したときには 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C で保温、反応させた。

マラリア DHFR 227 のピリメサミンに対する K_i を求めるときは反応に用いる DHF の濃度を 100, 50, 30 μ M に設定し、反応系のピリメサミンを 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 nM にして反応速度を出した。ウシ DHFR のピリメサミンに対する K_i を求めるときは反応に用いる DHF の濃度を 100, 50, 30 μ M に設定し、それぞれで反応系のピリメサミンを 0, 50, 100, 150, 200 nM にして反応速度を出した。

マラリア DHFR 227 のメトトリキセートに対する K_i を求めるときは反応に用いる DHF の濃度を 100, 50, 30 μ M に設定し、反応系のメトトリキセートを 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 nM にして反応速度を出した。ウシ DHFR のメトトリキセートに対する K_i を求めるときは反応に用いる DHF の濃度を 100, 50, 30 μ M に設定し、反応系のメトトリキセートを 0, 1, 2, 3, 4, nM にして反応速度を出した。これらの反応速度とその時の DHFR 阻害剤の濃度をもとに Dixon プロットによって K_i を求めた。

結果

熱帯熱マラリアDHFR遺伝子の設計

熱帯熱マラリア原虫のDHFRを大腸菌において効率よく発現させるために、アミノ酸配列はそのままにして各アミノ酸のコドン使用頻度を大腸菌DHFR型に変えたDHFR遺伝子を設計した。設計したのはDHFR-TS全体のDHFR部分に当たる部分で、大腸菌DHFRと熱帯熱マラリア原虫のDHFR-TSのアミノ酸配列における相同性を元に決定した(Bzik.D.J., *et al* 1987, 図1-6)。その結果熱帯熱マラリア原虫のDHFR-TS遺伝子中で2番目から228番目までのアミノ酸をコードする領域がDHFRをコードする領域と結論し、このアミノ酸塩基配列を元に人工遺伝子を合成DNAを用いて再構築した。

熱帯熱マラリア原虫のDHFRを大腸菌において効率よく発現させるために大腸菌において使用頻度の高いコドンを使えばよいが、それでは正しい立体構造をとらず、活性のない状態で発現されることが予想された為、コドンの使用頻度とその配列が大腸菌DHFR型に近い遺伝子を設計した。マラリア原虫のDHFR遺伝子のコドン使用頻度を大腸菌型に変えるにあたっては、まず熱帯熱マラリア原虫のDHFRと大腸菌DHFRの相同性をアミノ酸レベルで比較し(図1-6)、対応するアミノ酸で大腸菌と同じアミノ酸が使われている場合は大腸菌と同じコドンを使い、対応するアミノ酸で大腸菌と違うアミノ酸が使われている場合は対応する大腸菌のアミノ酸のコドン使用頻度に一番近い使用頻度のコドンを選んだ(表1-2)。大腸菌に対応するアミノ酸が無い場合は人工マラリア遺伝子でそれまでに使われたコドンと大腸菌のコドン使用頻度を比較して人工マラリア遺伝子でまだあまり使われていないコドンを使用し、遺伝子全体のコドン使用頻度を合わせるように選んだ。このようにして遺伝子の設計が終了した後、実際に人工遺伝子を構築する時のため、また遺伝子を完成させた後、DNA操作を簡便に行うために設計した遺伝子にコドン使用頻度があまり変わらない範囲内で制限酵素部位を加えた(図1-2)。

熱帯熱マラリアDHFRの大腸菌における発現

DHFRはあらゆる生物種の代謝系において重要な働きを担っており、その代謝バランスが崩れると致命的な影響を及ぼし、誘発させた蛋白質の収量が著しく下がることが予想された(Sirawaraporn.W., *et al* 1990, Hall.S.J., *et al* 1991, Horii.T., 未発表)。そのため誘発時以外にはマラリアDHFRのmRNAができるかぎり転写されない発現制御系を使った(図1-7, Morimatu.K., *et al* 1994)。

pET-3a P.f. DHFRにはマラリアDHFR遺伝子がクローニングされており、その上流にT7ファージのプロモーターがある。このプロモーターの支配下にある遺伝子は、大腸菌の持つRNAポリメラーゼによって転写されることはない。このため通常の状態ではマラリアDHFRは発現されない。マラリアDHFRを発現させるときはT7ファージのRNAポリメラーゼがクローニングされたM-13ファージpKM-2

<i>P.f.</i> aa seq	M	E	Q	V	C	D	V	F	D	I	Y	A
<i>P.f.</i> cDNA seq	ATG	GAA	CAA	GTC	TGC	GAC	GTT	TTC	GAT	ATT	TAT	GCC
<i>P.f.</i> syn.DNA seq	ATG	GAG	CAG	GTA	TGT	GAC	GTT	TTC	GAC	ATC	TAC	GCG
<i>E.coli</i> aa seq	-	-	-	-	-	-	-	-	M	I	D	L
<i>E.coli</i> DNA seq	ATG	ATC	AGT	CTG
	I	C	A	C	C	K	V	E	S	K	N	E
	ATA	TGT	GCA	TGT	TGT	AAG	GTT	GAA	AGC	AAA	AAT	GAG
	ATT	TGC	GCG	TGC	TGC	AAG	GTG	GAG	TCA	AAG	AAC	GAG
	I	A	A	L	A	V	D	R	-	-	-	-
	ATT	GCG	GCG	TTA	GCG	GTA	GAT	CGC
	G	K	K	N	E	V	F	N	N	Y	T	F
	GGG	AAA	AAA	AAT	GAG	GTT	TTT	AAT	AAC	TAC	ACA	TTT
	GGA	AAA	AAA	AAT	GAG	GTG	TTC	AAC	AAC	TAC	ACA	TTT
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	R	G	L	G	N	K	G	V	L	P	W	K
	AGA	GGT	CTA	GGA	AAT	AAA	GGA	GTA	TTA	CCA	TGG	AAA
	CGA	GGC	CTT	GGC	AAC	AAA	GGT	GTG	TTG	CCG	TGG	AAA
	-	V	I	G	M	E	N	A	M	P	W	-
	...	GTT	ATC	GGC	ATG	GAA	AAC	GCC	ATG	CCG	TGG	...
	C	N	S	L	D	M	K	Y	F	C	A	V
	TGT	AAT	TCC	CTA	GAT	ATG	AAA	TAT	TTT	TGT	GCA	GTT
	TGC	AAC	TCA	TTG	GAT	ATG	AAG	TAC	TTT	TGT	GCA	GTG
	N	L	P	A	D	L	A	W	F	K	R	N
	AAC	CTG	CCT	GCC	GAT	CTC	GCC	TGG	TTT	AAA	CGC	AAC

図1-6 熱帯熱マラリアDHFRと大腸菌DHFRの比較(1)
P.f. aa seq は熱帯熱マラリアDHFRのアミノ酸配列を示し、*P.f.* cDNA seq は熱帯熱マラリアDHFRのcDNA塩基配列を、*P.f.* syn.DNA seq は熱帯熱マラリアDHFRの再構成遺伝子を示す。同様に*E.coli* aa seq は大腸菌DHFRのアミノ酸配列を、*E.coli* DNA seq は大腸菌DHFRの塩基配列を示す。

<i>P.f.</i> aa seq	T	T	Y	V	N	E	S	K	Y	E	K	L
<i>P.f.</i> cDNA seq	ACA	ACA	TAT	GTG	AAT	GAA	TCA	AAA	TAT	GAA	AAA	TTG
<i>P.f.</i> syn.DNA seq	ACC	ACG	TAT	GTG	AAT	GAA	AGT	AAA	TAC	GAA	AAA	CTT
<i>E.coli</i> aa seq	T	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> DNA seq	ACC	TTA
	K	Y	K	R	C	K	Y	L	N	K	E	T
	AAA	TAT	AAG	AGA	TGT	AAA	TAT	TTA	AAC	AAA	GAA	ACT
	AAG	TAT	AAG	CGG	TGT	AAG	TAT	CTC	AAC	AAA	GAA	ACA
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	V	D	N	V	N	D	M	P	N	S	K	K
	GTT	GAC	AAC	GTC	AAT	GAT	ATG	CCT	AAC	TCT	AAA	AAA
	GTG	GAT	AAT	GTA	AAT	GAT	ATG	CCT	AAT	TCT	AAA	AAA
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	L	Q	N	V	V	V	M	G	R	T	T	W
	TTA	CAA	AAT	GTT	GTA	GTT	ATG	GGA	AGA	ACA	AAC	TGG
	CTG	CAG	AAC	GTC	GTT	GTA	ATG	GGC	CGC	ACG	ACC	TGG
	-	N	K	P	V	I	M	G	R	H	T	W
	...	AAT	AAA	CCC	GTG	ATT	ATG	GGC	CGC	CAT	ACC	TGG
	E	S	I	P	K	K	F	K	P	L	S	N
	GAA	AGC	ATT	CCA	AAA	AAA	TTT	AAA	CCT	TTA	AGC	AAT
	GAA	TCA	ATC	CCG	AAA	AAA	TTC	AAG	CCG	TTG	TCG	AAT
	E	S	I	G	-	-	-	R	P	L	P	G
	GAA	TCA	ATC	GGT	CGT	CCG	TTG	CCA	GGA
	R	I	N	V	I	L	S	R	T	L	K	K
	CGC	ATC	AAT	GTG	ATC	CTC	TCT	AGA	ACG	TTG	AAG	AAA
	AGG	ATA	AAT	GTT	ATA	TTG	TCT	AGA	ACC	TTA	AAA	AAA
	R	K	N	I	I	L	S	S	Q	P	-	G
	CGC	AAA	AAT	ATT	ATC	CTC	AGC	AGT	CAA	CCG	...	GGT

図1-6 熱帯熱マラリアDHFRと大腸菌DHFRの比較(2)

<i>P.f.</i> aa seq	E	D	F	D	E	D	V	Y	I	I	N	K
<i>P.f.</i> cDNA seq	GAA	GAT	TTT	GAT	GAA	GAT	GTT	TAT	ATC	ATT	AAC	AAA
<i>P.f.</i> syn.DNA seq	GAG	GAC	TTT	GAC	GAA	GAT	GTA	TAT	ATT	ATT	AAT	AAG
<i>E.coli</i> aa seq	T	D	D	R	-	-	V	T	W	V	K	S
<i>E.coli</i> DNA seq	ACG	GAC	GAT	CGC	GTA	ACG	TGG	GTG	AAG	TCG
	V	E	D	L	I	V	L	L	G	K	L	N
	GTT	GAA	GAT	CTA	ATA	GTT	TTA	CTT	GGG	AAA	TTA	AAT
	GTT	GAA	GAT	TTG	ATC	GTG	CTC	CTA	GGT	AAG	TTG	AAT
	V	D	E	A	I	A	A	C	G	D	V	P
	GTG	GAT	GAA	GCC	ATC	GCG	GCG	TGT	GGT	GAC	GTA	CCA
	Y	Y	K	C	F	I	I	G	G	S	V	V
	TAC	TAT	AAA	TGT	TTT	ATT	ATA	GGA	GGT	TCC	GTT	GTT
	TAC	TAC	AAA	TGC	TTT	ATT	ATT	GGC	GGC	AGC	GTT	GTT
	-	-	E	I	M	V	I	G	G	G	R	V
	GAA	ATC	ATG	GTG	ATT	GGC	GGC	GGT	CGC	GTT
	Y	Q	E	F	L	E	K	K	L	I	K	K
	TAT	CAA	GAA	TTT	TTA	GAA	AAG	AAA	TTA	ATA	AAA	AAA
	TAT	CAG	GAA	TTT	TTG	GAG	AAG	AAG	CTG	ATC	AAG	AAG
	Y	E	Q	F	L	-	-	P	K	A	Q	K
	TAT	GAA	CAG	TTC	TTG	CCA	AAA	GCG	CAA	AAA
	I	Y	F	T	R	I	N	S	T	Y	E	C
	ATA	TAT	TTT	ACT	AGA	ATA	AAT	AGT	ACA	TAT	GAA	TGT
	ATC	TAC	TTT	ACG	CGT	ATC	AAT	AGC	ACC	TAT	GAA	TGT
	L	Y	L	T	H	I	D	A	E	V	E	G
	CTG	TAT	CTG	ACG	CAT	ATC	GAC	GCA	GAA	GTG	GAA	GGC
	D	V	F	F	P	E	I	N	E	N	E	Y
	GAC	GTG	TTC	TTC	CCG	GAA	ATT	AAT	GAG	AAC	GAG	TAC
	GAT	GTA	TTT	TTT	CCA	GAA	ATA	AAT	GAA	AAT	GAG	TAT
	D	T	H	F	P	D	Y	E	P	D	D	W
	GAC	ACC	CAT	TTC	CCG	GAT	TAC	GAG	CCG	GAT	GAC	TGG

図1-6 熱帯熱マラリアDHFRと大腸菌DHFRの比較(3)

<i>P.f.</i> aa seq	Q	I	I	S	V	S	D	V	Y	T	S	N
<i>P.f.</i> cDNA seq	CAA	ATT	ATT	TCT	GTT	AGC	GAT	GTA	TAT	ACT	AGT	AAC
<i>P.f.</i> syn.DNA seq	CAG	ATA	ATC	TCC	GTC	AGC	GAC	GTC	TAC	ACC	TCT	AAC
<i>E.coli</i> aa seq	E	S	V	F	S	-	E	F	H	D	A	D
<i>E.coli</i> DNA seq	GAA	TCG	GTA	TTC	AGC	...	GAA	TTC	CAC	GAT	GCT	GAT
	N	-	-	-	T	T	L	D	F	I	I	Y
	AAT	ACA	ACA	TTG	GAT	TTT	ATC	ATT	TAT
	AAC	ACT	ACT	TTG	GAC	TTT	ATT	ATT	TAT
	A	Q	N	S	H	S	Y	C	F	E	I	L
	GCG	CAG	AAC	TCT	CAC	AGC	TAT	TGC	TTT	GAG	ATT	CTG
	K	K	*									
	AAG	AAA	...									
	AAG	AAG	TAA									
	E	R	R	*								
	GAG	CGG	CGG	TAA								

図1-6 熱帯熱マラリアDHFRと大腸菌DHFRの比較(4)

P. falciparum のコドン使用頻度

Phe TTT 2.49	Ser TCT 1.41	Tyr TAT 3.29	Cys TGT 1.33
Phe TTC 1.01	Ser TCC 0.67	Tyr TAC 0.59	Cys TGC 0.25
Leu TTA 5.12	Ser TCA 2.51	* TAA 0.13	* TGA 0.02
Leu TTG 0.81	Ser TCG 0.11	* TAG 0.02	Trp TGG 0.45
Leu CTT 0.98	Pro CCT 1.08	His CAT 1.90	Arg CGT 0.33
Leu CTC 0.22	Pro CCC 0.32	His CAC 0.93	Arg CGC 0.02
Leu CTA 0.34	Pro CCA 2.80	Gln CAA 2.65	Arg CGA 0.15
Leu CTG 0.04	Pro CCG 0.06	Gln CAG 0.27	Arg CGG 0.01
Ile ATT 2.69	Thr ACT 1.86	Asn AAT 7.41	Arg AGA 1.61
Ile ATC 0.40	Thr ACC 0.62	Asn AAC 2.11	Arg AGG 0.28
Ile ATA 2.31	Thr ACA 2.39	Lys AAA 8.46	Ser AGT 2.25
Met ATG 1.82	Thr ACG 0.19	Lys AAG 1.56	Ser AGC 0.42
Val GTT 2.19	Ala GCT 2.07	Asp GAT 5.58	Gly GGT 2.54
Val GTC 0.31	Ala GCC 0.70	Asp GAC 0.79	Gly GGC 0.19
Val GTA 2.11	Ala GCA 2.68	Glu GAA 7.55	Gly GGA 3.14
Val GTG 0.29	Ala GCG 0.07	Glu GAG 0.81	Gly GGG 0.19

E.coli のコドン使用頻度

Phe TTT 1.85	Ser TCT 1.04	Tyr TAT 1.49	Cys TGT 0.47
Phe TTC 1.82	Ser TCC 0.96	Tyr TAC 1.34	Cys TGC 0.62
Leu TTA 1.03	Ser TCA 0.63	* TAA 0.20	* TGA 0.08
Leu TTG 1.12	Ser TCG 0.79	* TAG 0.02	Trp TGG 1.28
Leu CTT 0.99	Pro CCT 0.65	His CAT 1.15	Arg CGT 2.47
Leu CTC 0.98	Pro CCC 0.42	His CAC 1.10	Arg CGC 2.20
Leu CTA 0.30	Pro CCA 0.81	Gln CAA 1.30	Arg CGA 0.31
Leu CTG 5.48	Pro CCG 2.42	Gln CAG 3.01	Arg CGG 0.46
Ile ATT 2.70	Thr ACT 1.05	Asn AAT 1.59	Arg AGA 0.20
Ile ATC 2.71	Thr ACC 2.46	Asn AAC 2.42	Arg AGG 0.13
Ile ATA 0.38	Thr ACA 0.64	Lys AAA 3.69	Ser AGT 0.71
Met ATG 2.65	Thr ACG 1.25	Lys AAG 1.19	Ser AGC 1.50
Val GTT 2.04	Ala GCT 1.78	Asp GAT 3.20	Gly GGT 2.80
Val GTC 1.43	Ala GCC 2.37	Asp GAC 2.23	Gly GGC 3.07
Val GTA 1.18	Ala GCA 2.06	Glu GAA 4.37	Gly GGA 0.67
Val GTG 2.53	Ala GCG 3.33	Glu GAG 1.93	Gly GGG 0.96

表 1-2 熱帯熱マラリアと大腸菌のコドン使用頻度(%)

1991年12月までに GenBank に登録された遺伝子を基に算出された。熱帯熱マラリアのコドン使用頻度は39遺伝子より、大腸菌のコドン使用頻度は941遺伝子より算出された(Wada.K., *et al*, 1992)。

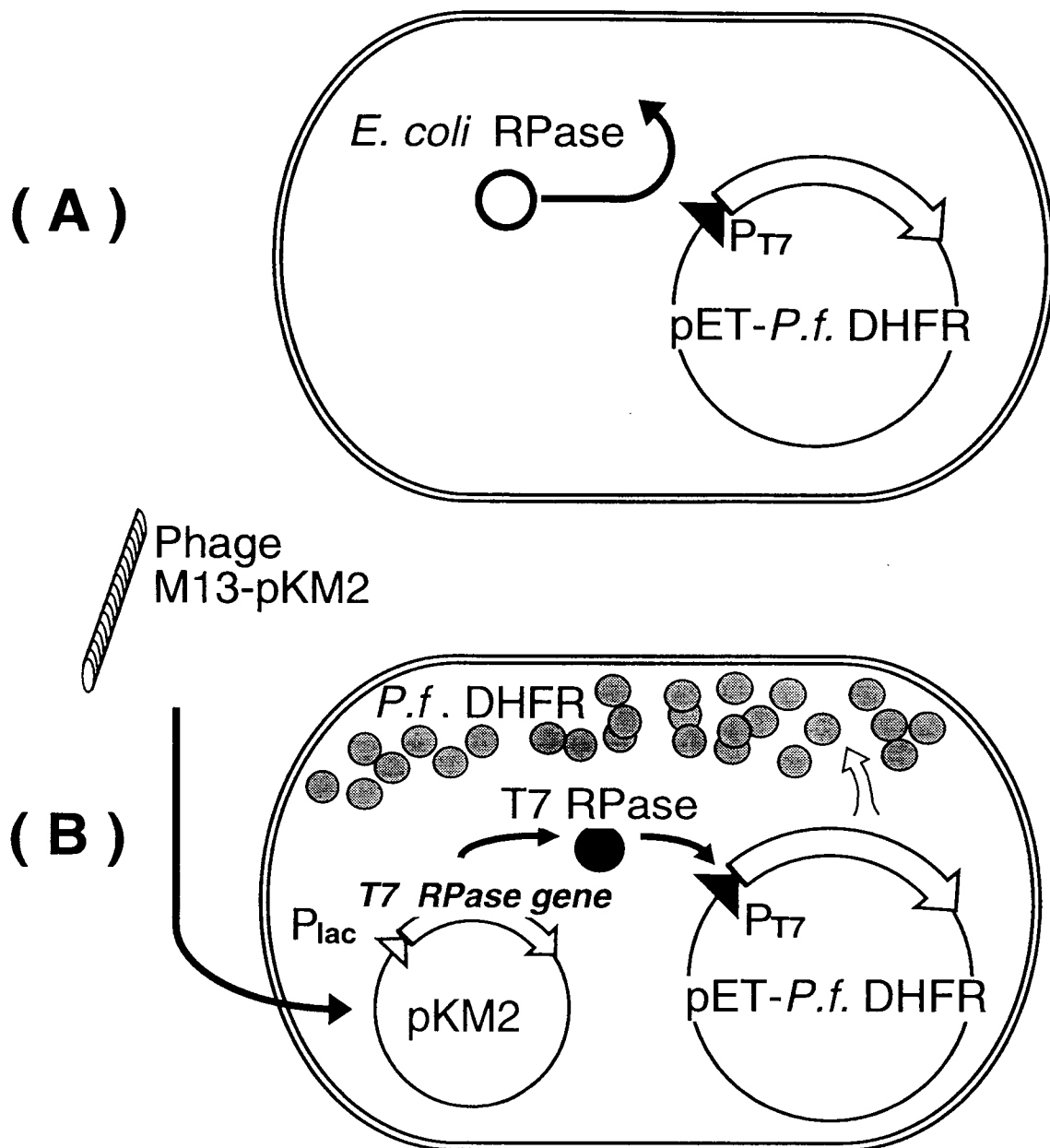


図 1-7 pKM-2 ファージによるマラリアDHFRの発現
 マラリアDHFR遺伝子はT7ファージのプロモーターの支配下にあり、通常pKM-2ファージが大腸菌に感染していないときはそのmRNAが転写されず、マラリアDHFRは発現されることはない(A)。pKM-2ファージが大腸菌に感染するとT7ファージのRNAポリメラーゼが発現され、マラリアのDHFRが発現される。

を pET-3a *P.f.* DHFR の入った大腸菌 JM 103 に感染させる。pKM-2 にクローニングされている T7 RNA ポリメラーゼは Lac-Iq オペロンの支配下にあり、IPTG によって発現される。大腸菌 JM 103 に pKM-2 感染させるとき初めて T7 RNA ポリメラーゼが JM 103 に導入され、マラリア DHFR が発現される機構になっている。上記の方法でマラリア DHFR 遺伝子を誘発させたところ、誘発した蛋白は全蛋白の 30% をしめており、マラリア DHFR 遺伝子の塩基配列より予測される分子量の所に明確なバンドが存在していた(図1 - 8, Lane-3)。

レコンビナント DHFR の再活性化

レコンビナント DHFR を誘発させた大腸菌の細胞を超音波破壊法によって破壊した後、10 000xg の遠心にかけて上清と沈澱に分離したところ、誘発した蛋白は殆ど沈澱分画に存在することが判明した(図 - 8, Lane 4.5)。また上清と沈澱分画の両方について DHFR 活性を調べたところ、上清にはコントロール (マラリア DHFR 遺伝子のクローニングされていない pET-3a を大腸菌 JM 103 に導入し、これを pKM-2 によって誘発する) に比べ DHFR 活性がかなり存在するが、沈澱分画には活性はほとんど存在していないことが判明したため、沈澱分画の DHFR を再活性化させることにした。

レコンビナント DHFR を誘発した大腸菌 5 g を sucrose buffer に溶かし、細胞を超音波破壊法によって破壊した後、8000xg の遠心にかけて上清と沈澱に分離した。沈澱分画に各濃度の尿素 (0-5M) の入った buffer を沈澱分画に加えたところ、5 M で不溶性の沈澱分画が可溶化し、その分画を反応系に移し、活性を測定したが DHFR 活性は他の濃度の分画に比べて全く上がらなかった (データ未掲載)。0 - 4 M の塩酸グアニジンの入った buffer で試したところ、0.25 M より誘発蛋白質が可溶化した。塩酸グアニジンの濃度を 4 M まで上げてみたが、SDS ゲル電気泳動法によって見た限りでは可溶化分画に存在する誘発蛋白質の量は同じであった。その分画を反応系に移し、活性を測定したところ DHFR 活性は 0 M から 4 M まで塩酸グアニジンの濃度上昇に伴って DHFR 活性は上がり続けた(図1 - 9)。

活性化した誘導蛋白質が塩酸グアニジンによってどのような影響を受けるかを調べるため、塩酸グアニジンの活性を持っている分画に対する効果を調べてみた。レコンビナント DHFR を誘発し、細胞破壊した大腸菌の上清 (DHFR 活性がかなりあり、塩酸グアニジンは含まれていない) と、各濃度の塩酸グアニジンを反応系に入れて 37 度で 10 分間保温した後活性を調べたところ、0 - 50 mM で活性が上昇し、100 mM 以上では逆に活性が減少した(図 1 - 10)。このことは沈澱分画に存在する誘導蛋白質を効率よく再活性化させるためには、誘導蛋白質が再活性化した後に 4 M までに上がった塩酸グアニジンの濃度を速やかに落とさなくてはならないことを示している。一度 4 M まで上がった塩酸グアニジンの濃度を 100 mM 付近にまで一気に落とすためには塩酸グアニジンが 0 M の buffer を再活性化した沈澱分画に加えて塩酸グアニジンの濃度をすぐに下げる方法を考えた。この方法では再活性化した蛋白

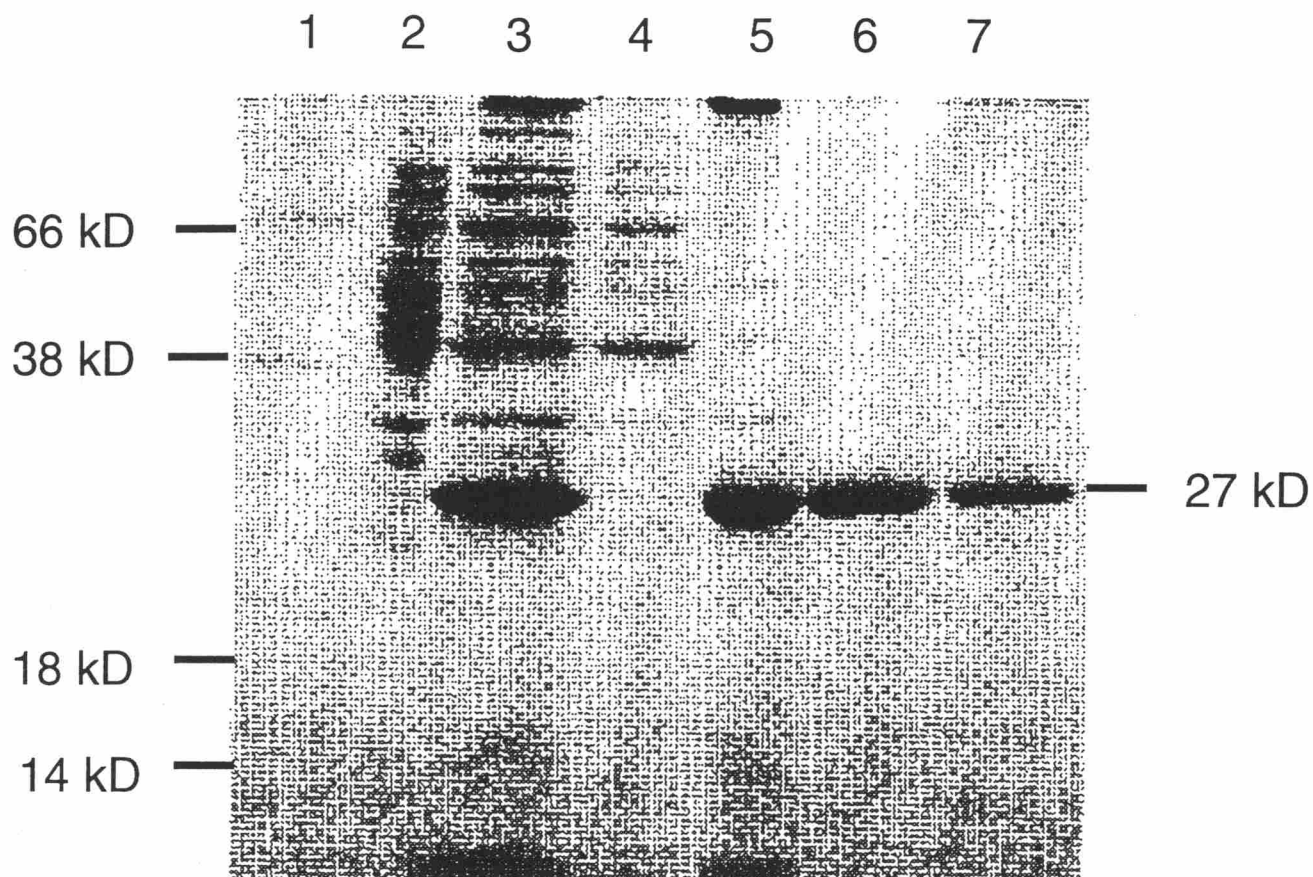


図1-8 マラリアDHFRのSDSゲル電気泳動

大腸菌において発現されたマラリアDHFRの各精製ステップを12.5%のSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。Lane 1: 分子量マーカー 66kD:BSA, 38kD:RecA, 18kD:β-lactoglobulin, 14kD: lysozyme, Lane 2: マラリアDHFR非誘発大腸菌, Lane 3: マラリアDHFR誘発大腸菌, Lane 4: 誘発大腸菌細胞破壊後の沈殿分画, Lane 5: 誘発大腸菌細胞破壊後上清, Lane 6: ヒドロキシアパタイトカラム後の分画, Lane 7: S-300ゲルフィルトレーション後の分画

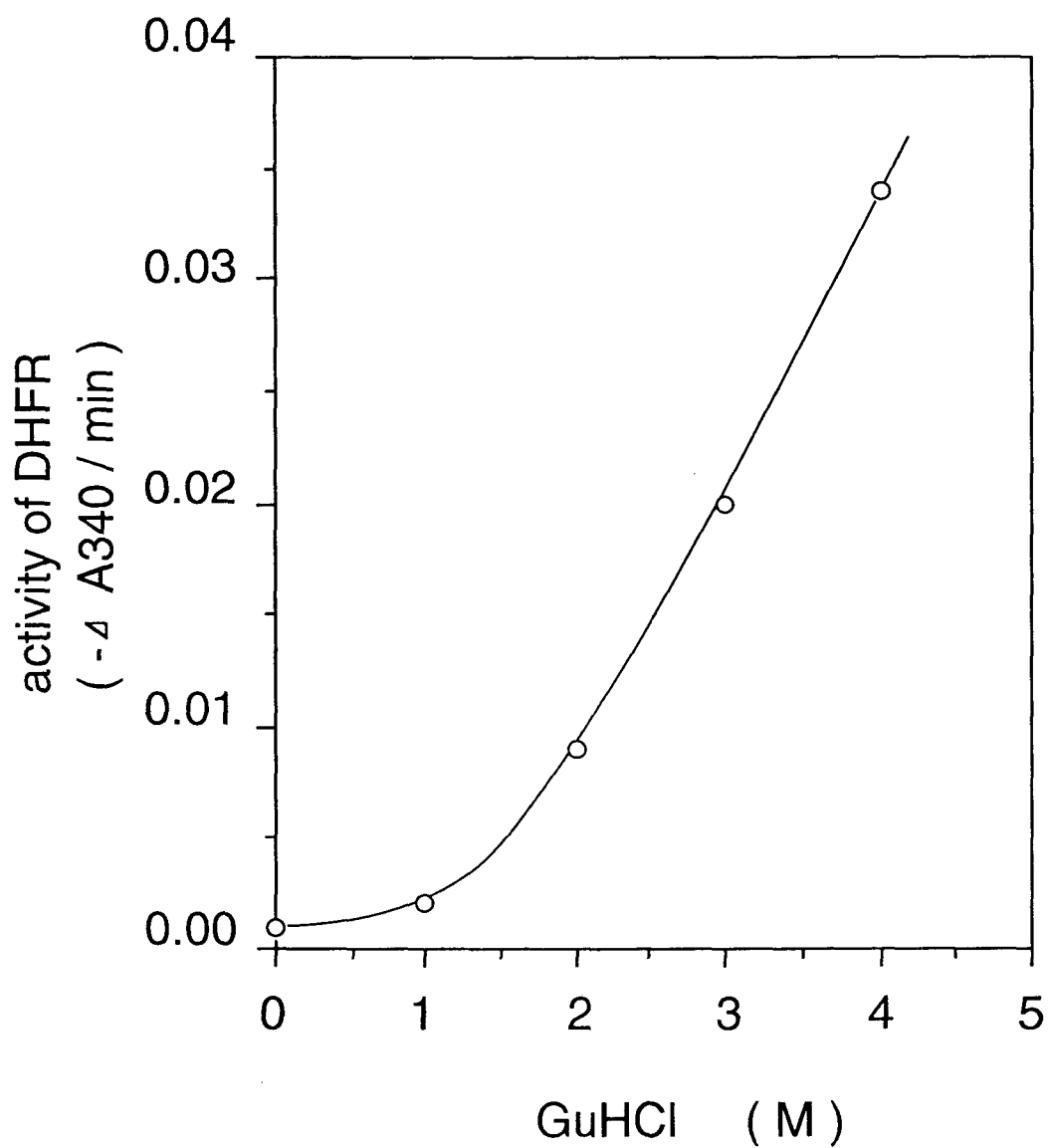


図1-9 塩酸グアニジンによるマラリアDHFRの再活性化
 0 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, の塩酸グアニジンの入った buffer 10 ml
 で0.3g 相当の細胞破壊後の沈殿分画を可溶化した。その後 10 μ l
 を反応系に加えてDHFR活性を測定した。
 反応条件は材料と方法に記した。

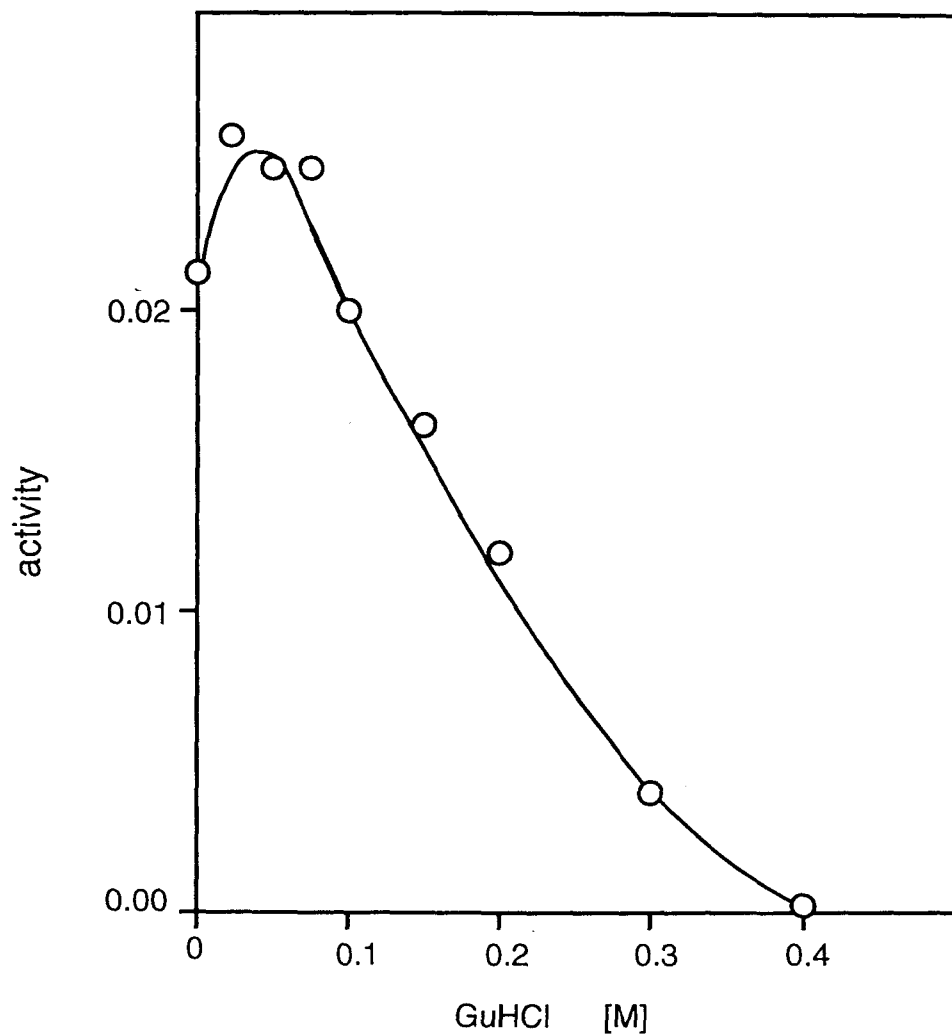


図 1-10 塩酸グアニジンの反応系における影響

熱帯熱マラリアDHFRを誘発させた大腸菌約 2 g を sucrose buffer 25m l に懸濁して細胞を破壊した後、遠心 (8000 r.p.m 20min) にかけて上清を取る。これを反応系に入れて37 度で10 分間保温し、その後活性を測定した。実験条件は材料と方法に記した。

溶液の体積が塩酸グアニジンによって可溶化した段階に比べ、40-80倍の体積になってしまう。そこで沈澱を可溶化する時に用いる4Mの塩酸グアニジン buffer の体積を変えて、沈澱分画の再活性化にどのような影響が出るかを調べた。

レコンビナントDHFRを誘発させた大腸菌 1.25 g 分の沈澱分画を4Mの塩酸グアニジン buffer 10 ml に溶かし、これを2.5 ml ずつ4つに分け、更にそれぞれを0, 2.5, 7.5, 17.5 ml の4Mの塩酸グアニジン buffer で薄めた。その後に塩酸グアニジンの濃度を下げるため、4つの溶液から1 ml ずつ取って燐酸 buffer で25倍に薄め、それぞれの溶液のDHFR活性を測定した。この結果4Mの塩酸グアニジン buffer の体積が大きいほど全体の活性は上がることが判明した(図1-11)。

これらの結果から一度重合状態になったレコンビナントDHFRを可溶化、再活性化させるには4Mの塩酸グアニジン buffer で可溶化した後、さらに燐酸 buffer によって少しずつ薄め、なるべく早めに100 mMにまで濃度を下げなくてはならないことが分かった。このことは、仮に5gの大腸菌より精製を始めた場合、4Mの塩酸グアニジン濃度を100 mMにまで下げると12.8 Lになることを意味している。これでは大き過ぎるので5gの大腸菌を4Mの塩酸グアニジン buffer 320 ml に溶かして25倍の濃度に薄める方法を採用した。この場合塩酸グアニジンの濃度は160 mM で体積は8Lになる。

レコンビナントDHFRの単離精製

再活性化した分画はヒドロキシアパタイトカラムとSephacril S-300 ゲルフィルトレーションカラムを使って精製した。ヒドロキシアパタイトカラム後のサンプルとS-300 ゲルフィルトレーション後の分画をSDSゲル電気泳動にかけ、デンストメトリーにかけて27 KDa のバンドの比率を観たところ88%と98%であった(図1-8, Lane 6,7)。ヒドロキシアパタイトカラム後の分画をペプチドシーケンサーによってN末端のアミノ酸10残基について調べたところ、当初設計した熱帯熱マラリアDHFRと一致することが分かった。また分光光度計によって蛋白質の量を測定した結果、大腸菌5gより約10mgのレコンビナントDHFRが単離精製されていることがわかった。

最終分画における活性の検討

上記の方法で調製したDHFRは塩酸グアニジンによる活性化を行っているため、その最終標品に失活したDHFRを含んでいる可能性がある。失活したDHFRが含まれているのか、又どの程度含まれているのかを調べるため、DHFRの阻害剤を反応系に入れ、酵素濃度と阻害剤のモル比とその阻害効果を測定することによって失活したDHFRの割合を調べた。使用した阻害剤であるピリメサミンとメトトリキセートはいずれもDHFRの基質であるジヒドロ葉酸のアナログであり、拮抗阻害という阻害形式を取っている(図1-17)。図1-12(A)のグラフはDHFRに対する阻害剤としてメトトリキセートを使っている。反応系における阻害剤とDHFRのモル比

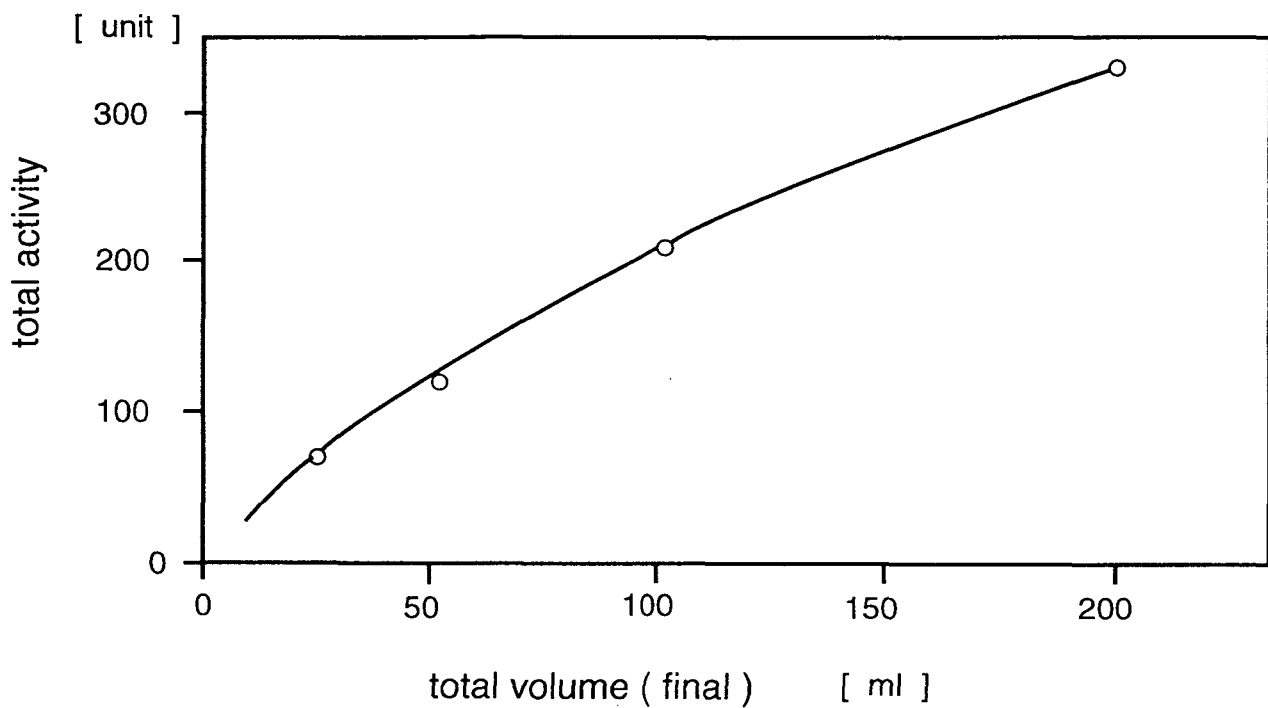


図 1-11 可溶化分画の希釈による活性の変化

熱帯熱マラリア DHFR を誘発させた大腸菌を 1.25 g を sucrose buffer に懸濁して細胞を破壊した後、遠心 (8000 r.p.m. 20 min)、にかけ、沈殿分画を 4M の塩酸グアニジン buffer 10ml で懸濁させる。これを 2.5ml ずつ 4 つに分け、さらに 4M の塩酸グアニジン buffer をそれぞれ 0、2.5、7.5、17.5ml ずつ加える。それぞれより 1ml ずつ取りこれに 磷酸 buffer を 24ml ずつ加える。これを 5 μ l ずつ取って活性を測定し、それをもとに総活性量を算出する。実験条件は材料と方法に記した。

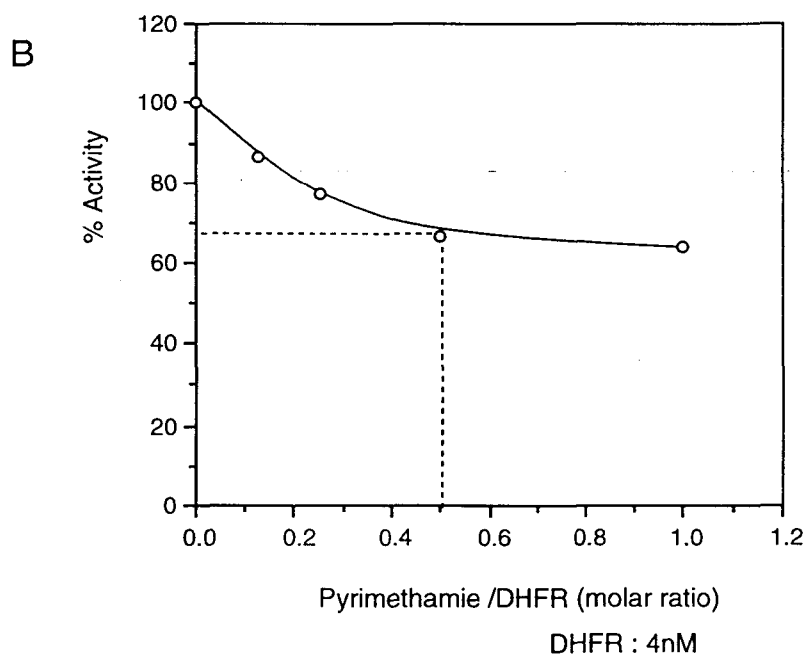
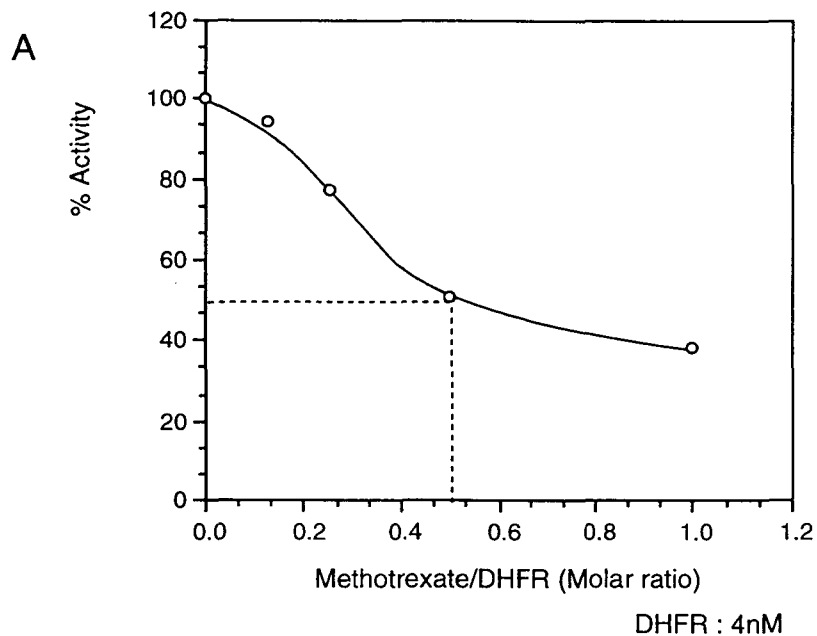


図 1-12 メトトリキセートとピリメサミンによるマラリアDHFRの滴定
 A の反応系にはメトトリキセートが、B にはピリメサミンが0-4 nMの濃度で入っている。
 反応系のマラリアDHFRは4 nM入っている。

が1対2の時に活性もちょうど50%に下がっており、調製したDHFRには失活した酵素はほとんど含まれていない事が示されている。ピリメサミンを使った図1-12(B)のグラフではモル比が1対2の時に活性が約30%しか下がっていない。その理由としてはモル比が1:2の時にピリメサミンの濃度は2 nMとなるが、DHFRのピリメサミンに対する K_i は4.14 nMと高く、この条件下では結合定数が低いため全ピリメサミンがDHFRに結合していないためであると考えられる。以上の結果は最終分画に失活したDHFRは殆ど含まれていない事を示している。

DHFRの反応条件依存性と酵素学的定数

マラリアDHFRの活性が反応条件の変化によってどのような影響を受けるかを調べてみた。又、これに対するコントロールにウシのDHFRについても調べてみた。ウシのDHFRは比較的なだらかな活性曲線を示すのに比べ、マラリアDHFRはpH 6-7の辺に他のpHに比べて強い活性を示しているのが分かった(図1-13)。マラリアDHFRが温度に対してどのような影響を受けるかを調べてみた。又、これに対するコントロールにウシのDHFRについても調べてみた。ウシのDHFRは温度と共に活性も上がっていくが、マラリアDHFRは25℃位の低温条件においても80%程の活性を維持している(図1-14)。

単離精製したマラリアDHFRの k_{cat} と各基質に対するミカエリス定数 K_m 、そして各阻害剤に対する阻害定数 K_i を求めた。マラリアDHFRの k_{cat} 13.2 (1/min)でウシDHFRの k_{cat} は100 (1/min)であった。マラリアDHFRはウシに比べ1/15の活性しか持っていないことになる。マラリアDHFRの基質であるジヒドロ葉酸に対する K_m が66.6 μ Mで、NADPHに対する K_m が90.2 μ Mであった。一方ウシDHFRのDHFに対する K_m が1.5 μ Mで、NADPHに対する K_m が5.2 μ Mであった(図1-15,16)。マラリアDHFRのピリメサミンに対する K_i が4.14 nMで(図1-17)ウシDHFRのピリメサミンに対する K_i が4.1 nMであった(図1-18)。マラリアDHFRのメトトリキセートに対する K_i が1.28 nM(図1-17)でウシDHFRのメトトリキセートに対する K_i が0.088 nMであった(図1-18,表1-3)。ピリメサミンに対する K_i はウシDHFRとマラリアDHFRの間で変化は無かった。抗マラリア剤であるピリメサミンは哺乳類であるウシDHFRよりもマラリアDHFRをより強く阻害することが予想されるが、上記の結果はピリメサミンはウシDHFRとマラリアDHFRを同じ強さで阻害しており、酵素レベルでは薬剤の選択性を説明できないことを示している。

マラリアDHFR遺伝子の伸張

これまでの実験で単離精製したレコンビナントDHFRの生化学的な解析結果を実際にマラリア原虫より精製されたDHFR-TSのものと比較すると、基質と阻害剤に対する親和性に5倍から20倍程の差が見受けられた(表1-3)。また抗マラリア剤として使用されており、マラリアDHFRを選択的に阻害しているはずのピリメ

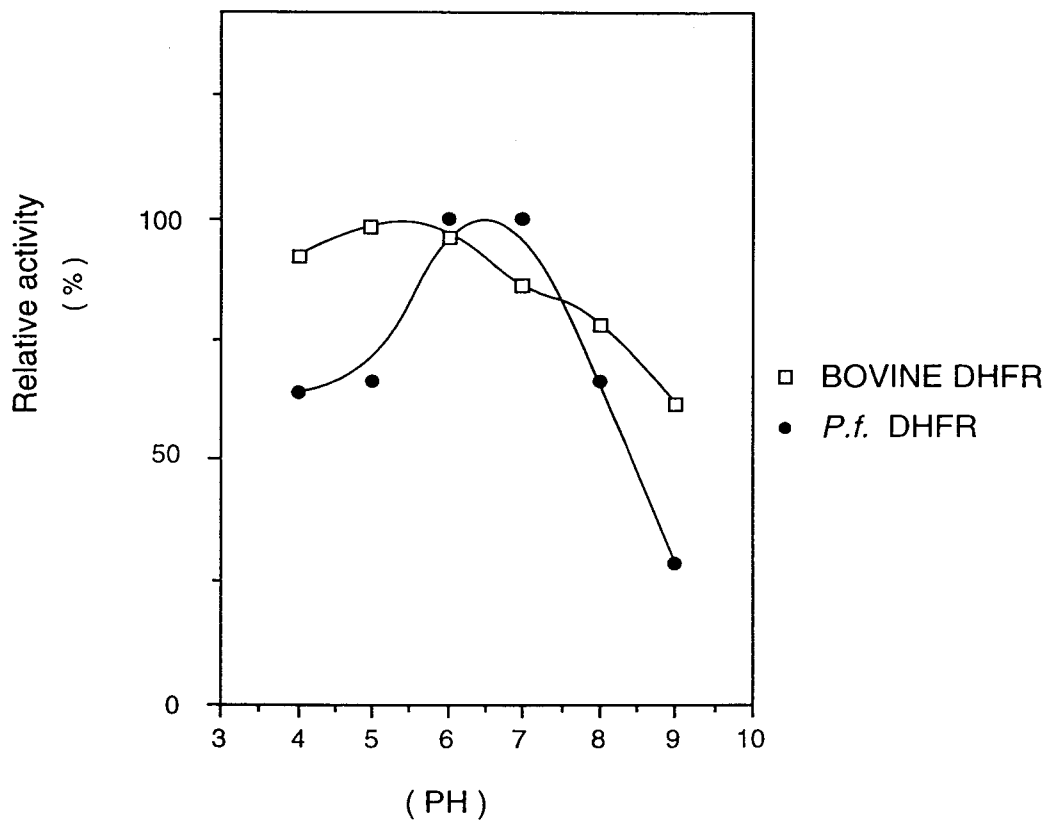


図 1-13 熱帯熱マラリアとウシDHFRの pH による影響

熱帯熱マラリアとウシDHFRの pH による活性の変化を測定した。pH4-5 で測定したときには酢酸ナトリウムを50mM、pH6-7 で測定したときには磷酸 buffer を20mM、pH8-9 で測定したときにはTris buffer を50mMで使用した。その他は70mM 2-SH, 1mM EDTA 100g/mlBSA, 100 μ M NADPH, 100 μ M DHF, 20.3nMマラリアDHFRまたは37.8nMウシDHFR; 反応液の体積は200 μ l. 37 Cで2分間保温した後、DHFを加えることによって開始される。反応は340nmの吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

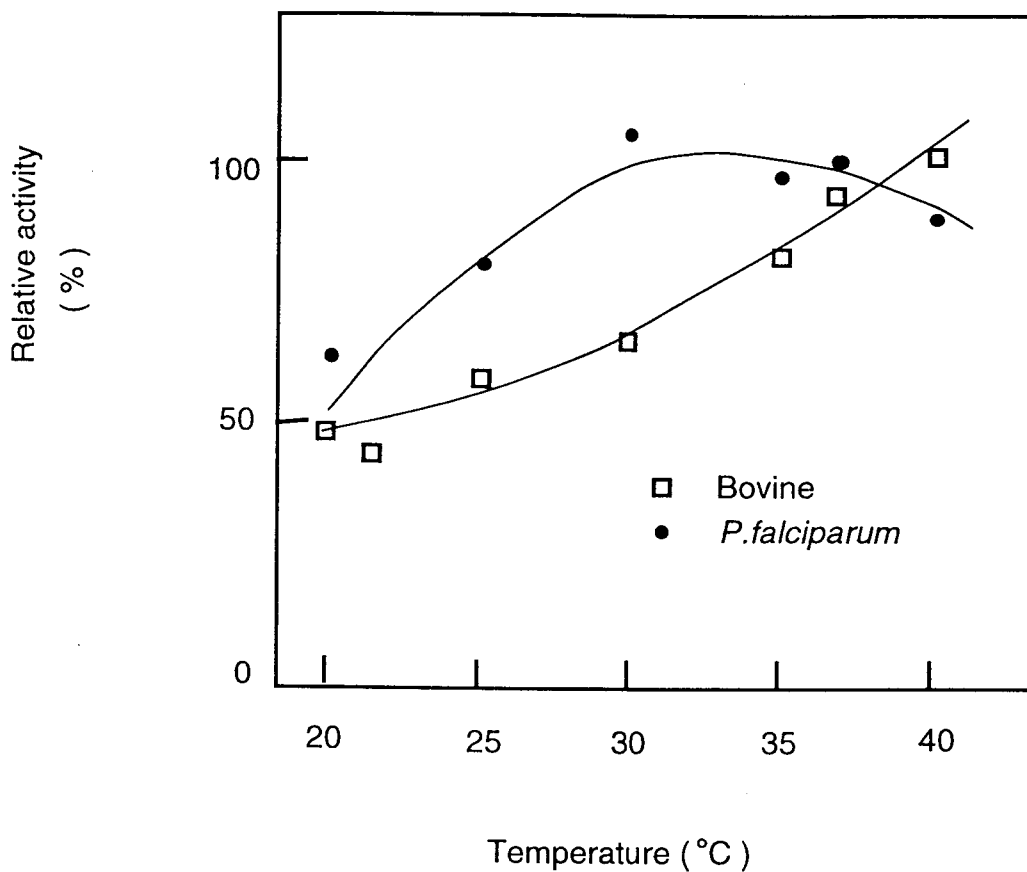


図 1-14 熱帯熱マラリアとウシDHFRの温度による影響
 熱帯熱マラリアとウシDHFRの温度による活性の変化を測定した。反応液の体積は200ml, Tris HCl pH 7.6 50mM, 70mM 2-SH, 1mM EDTA 100 μ g/ml BSA, 100 μ M NADPH, 100 μ M DHF, 20.3nMマラリアDHFRまたは37.8nMウシDHFR; 反応を37 Cで2分間保温した後、DHFを加えることによって開始される。反応は340 nmの吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

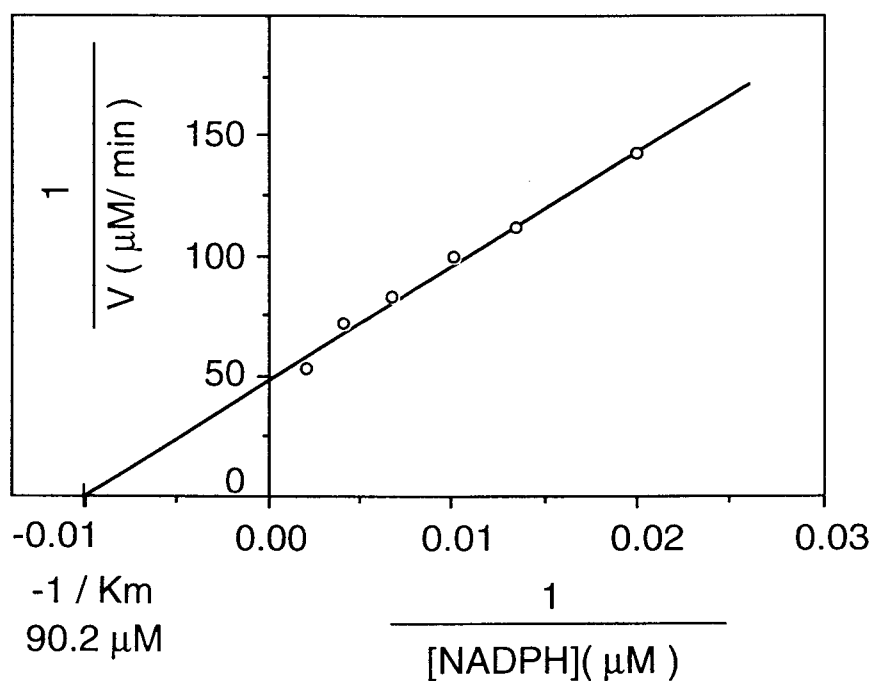
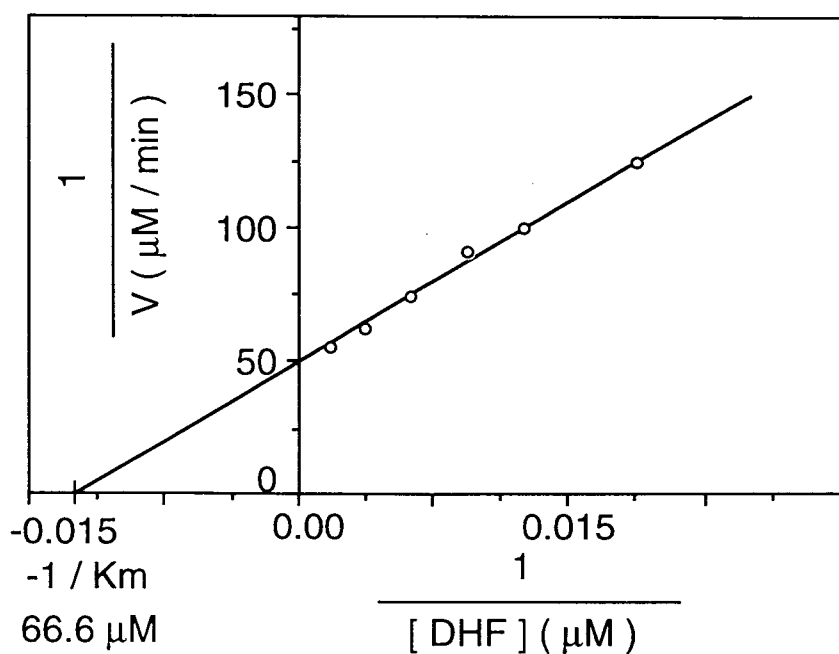


図 1-15 マラリアDHFRのミカエリス定数

マラリアDHFRのミカエリス定数を測定した。反応液の体積は200 μ l : 50mM Tris HCl 70mM β -SH, 1mM EDTA, 100 μ g/ml BSA, 300-25 μ M NADPH, 300-25 μ M DHF, 8.9nMマラリアDHFR ; 37度で2分間保温した後、DHFを加えることによって反応が開始される。反応は340nmの吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

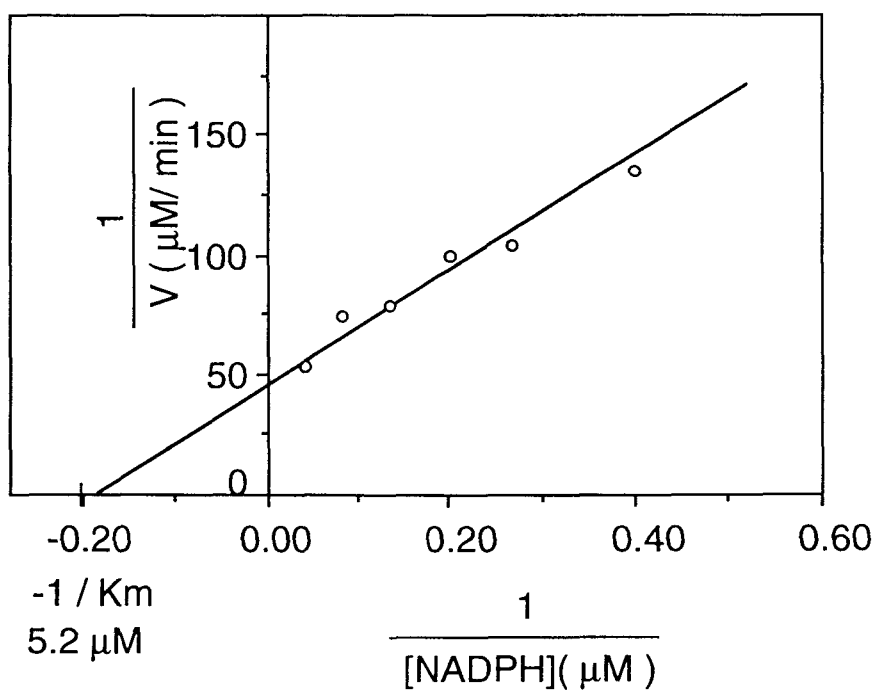
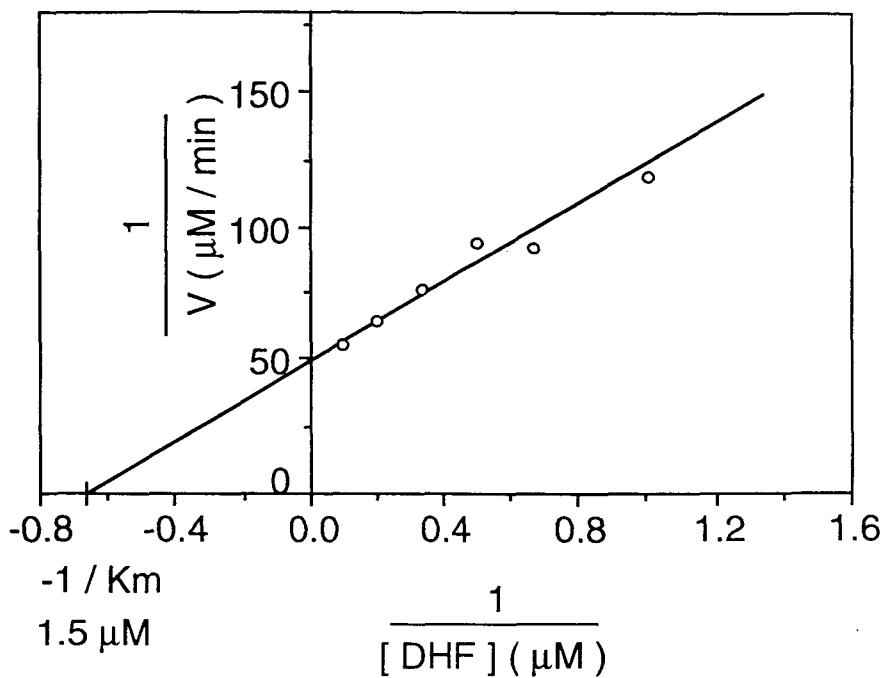


図 1-16 ウシDHFRのミカエリス定数

ウシDHFRのピリメサミンに対するミカエリス定数を測定した。反応液の体積は $200 \mu\text{l}$: 50mM Tris HCl 70mM -SH, 1mM EDTA, $100 \mu\text{g/ml}$ BSA, $100\text{-}15 \mu\text{M}$ NADPH, $100\text{-}15 \mu\text{M}$ DHF, 18.9nM ウシDHFR ; 37 度で2分間保温した後、DHFを加えることによって反応が開始される。反応は 340nm の吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

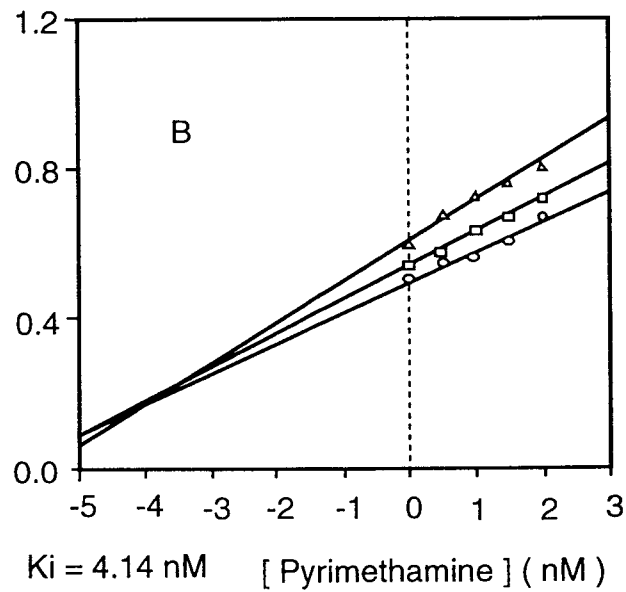
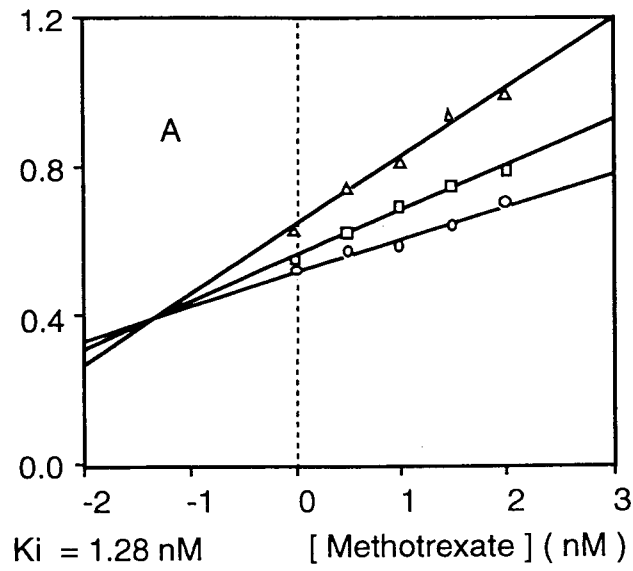


図 1-17 熱帯熱マラリアDHFRに対するメトトリキセートと
 ピリメサミンに対する阻害効果のDixon plot
 反応条件は材料と方法に記してあるとおり。ただし、ジヒドロ葉酸の濃度は
 300,150,100 mM, NADPHは300mM。メトトリキセートとピリメサミンの濃
 度は0-2 nMの間で変化させた。

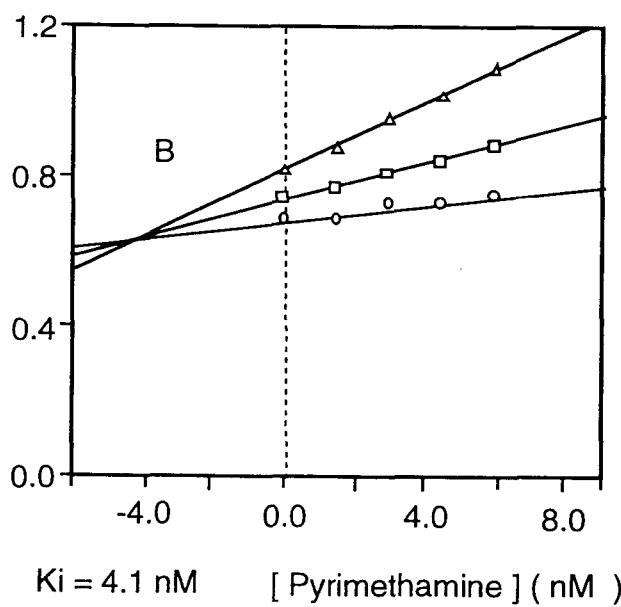
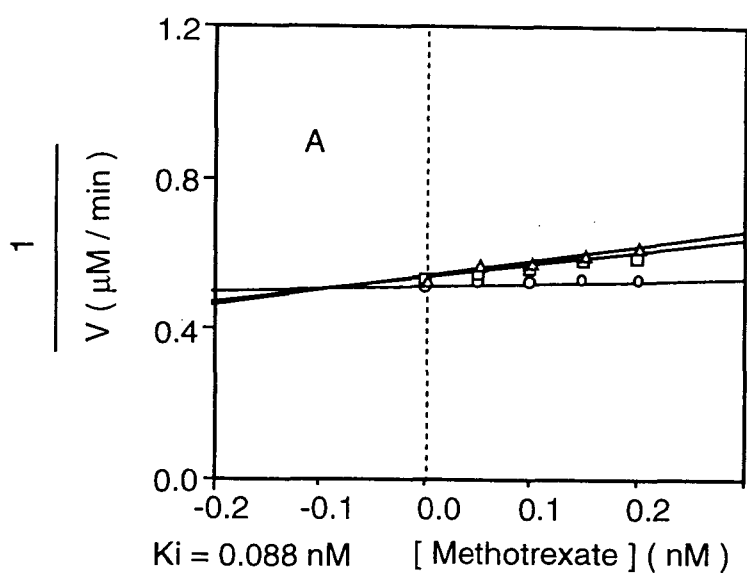


図 1-18 ウシDHFRに対するメトトリキセートと
 ピリメサミンに対する阻害効果のDixon plot
 反応条件は材料と方法に記してあるとうり。ただし、ジヒ
 ドロ葉酸の濃度は 100,50,30 μM , NADPH は 100 μM 。メトト
 リキセートとピリメサミンの濃度は 0 - 0.2, 0 - 6.0nMの間
 で変化させた。

		Reconstructed <i>P. f.</i> DHFR	native DHFR		Reconstructed <i>P. f.</i> DHFR
		(Ser108)	(3D7)	(bovine)	(S 108) §
kcat	(1/sec)	13.1±11	75.7 ± 11	100 ±8	88.4± 6.3 §
Km ^{DHF}	(μM)	66.6±2.6	3.2 ±0.6 *	1.5 ±0.3	12.9 ± 4.9 §
Km ^{NADPH}	(μM)	90.2±4.3	4.5 ±0.5 *	5.2 ±0.08	4.7 ±1.3 §
Ki ^{Pyr}	(nM)	4.14±0.16	0.19 ±0.08 *	4.1 ±0.4	1.5 ±0.17 §
Ki ^{MTX}	(nM)	1.28±0.05	0.24±0.003 *	0.88 ±0.08	—

* : Zolg.J.W. , *et al* (1987)

* : Guo-Xian.C., and Zolg.J.W., (1988)

§ : Sirawaraporn.W., *et al* (1993)

表 1-3 測定されたDHFR酵素活性の比較

再構築された遺伝子を用いて調製されたレコンビナントマラリアDHFR (Ser 108)と、マラリア原虫より精製されたDHFR-TS (3D7)、ウシDHFR、別のグループによって再構築されたマラリアDHFR遺伝子と大腸菌を用いて調製されたレコンビナントマラリアDHFR (108S) の酵素活性をまとめた。

サミンに対する K_i がウシ DHFR とマラリア DHFR の間で変化は無かった。一方このデータが出てしばらくしてからほとんど同じ実験を行い、しかも我々の出した数値よりネイティブの DHFR-TS に近い数値を測定したという報告があった (Sirawaraporn.W., et al 1993, 表 1-3)。このグループと私が行った実験との違いは実験方法そのものにはほとんど無く、上記のグループの構築したマラリア DHFR 遺伝子が私の物よりアミノ酸にして N 末端に一つ、C 末端に 3 つの計 4 つのアミノ酸を余分にコードしていた。私が調製したマラリア DHFR はマラリア原虫の DHFR-TS 全体における DHFR 部位の設定に問題があるためにネイティブの DHFR-TS の酵素活性と異なった活性を示したと考え、ネイティブの DHFR-TS の酵素活性に近いレコンビナント DHFR を得るため、遺伝子の伸張を試みた。上記のグループが構築したレコンビナント DHFR は私の物に比べて N 末端と C 末端を伸ばしているため、N 末端のみが活性に影響している可能性と C 末端のみが活性に影響している可能性、そして N 末端と C 末端がそろって活性に影響している可能性の 3 通りが考えられた。これまでの実験で構築してきたレコンビナント DHFR の N 末端を伸ばす時にはメチオニンを 2 つにする場合の 1 通りしかない。よって C 末端を伸ばす時には同時に N 末端を伸ばす場合と伸ばさない場合の 2 通りに分けた。

新しく構築した遺伝子は以下の 11 種類である。

- 1)レコンビナント DHFR の N 末端を 1 つ伸ばし、C 末端を 3 つ伸ばしたもの。これは上記のグループが構築したマラリア DHFR 遺伝子と同じアミノ酸配列をコードする (アミノ酸数 231: DHFR 231, 図 1-19)。
- 2)レコンビナント DHFR の C 末端を 3 つ伸ばし、N 末端は伸ばさないもの (アミノ酸数 230: DHFR 230, 図 1-19)。
- 3)N 末端を 1 つだけ伸ばしてメチオニンを 2 つにしたもの (アミノ酸数 228: DHFR 228, 図 1-19)。
- 4)C 末端をアミノ酸にして 13 残基多いところに C 末端を設定し、N 末端を 1 つだけ伸ばしてあるもの。これはアミノ酸にして 241 番目のところにグリシンがコードされていることに起因している。C 末端をグリシンで切ったのはグリシンは他のアミノ酸に比べ、はるかに立体障害の少ないコンフォメーションを取ることができるためである。junction 部分に存在するグリシンはここにしかないことより、このグリシンは構造的、もしくは機能的な区切りであると考えたため、この位置に C 末端を設定した (アミノ酸数 241: ; DHFR 241, 図 1-19)。
- 5)C 末端を 13 残基多いところに設定し、N 末端のメチオニンが 1 つのもの (アミノ酸数 240: DHFR 240, 図 1-19)。
- 6)C 末端をアミノ酸にして 52 残基多いところに C 末端を設定し、N 末端を 1 つだけ伸ばしてあるもの。これは 280 番目から 288 番目のアミノ酸までに存在する、一にチャージしたアミノ酸が 9 つ連なっている部分の直前で切ったものである。この部分は蛋白質中に存在する事は事実上不可能であり、この部分のみは DHFR 部分と TS 部分を繋ぐ junction 部分として水溶液中に存在していることが予想

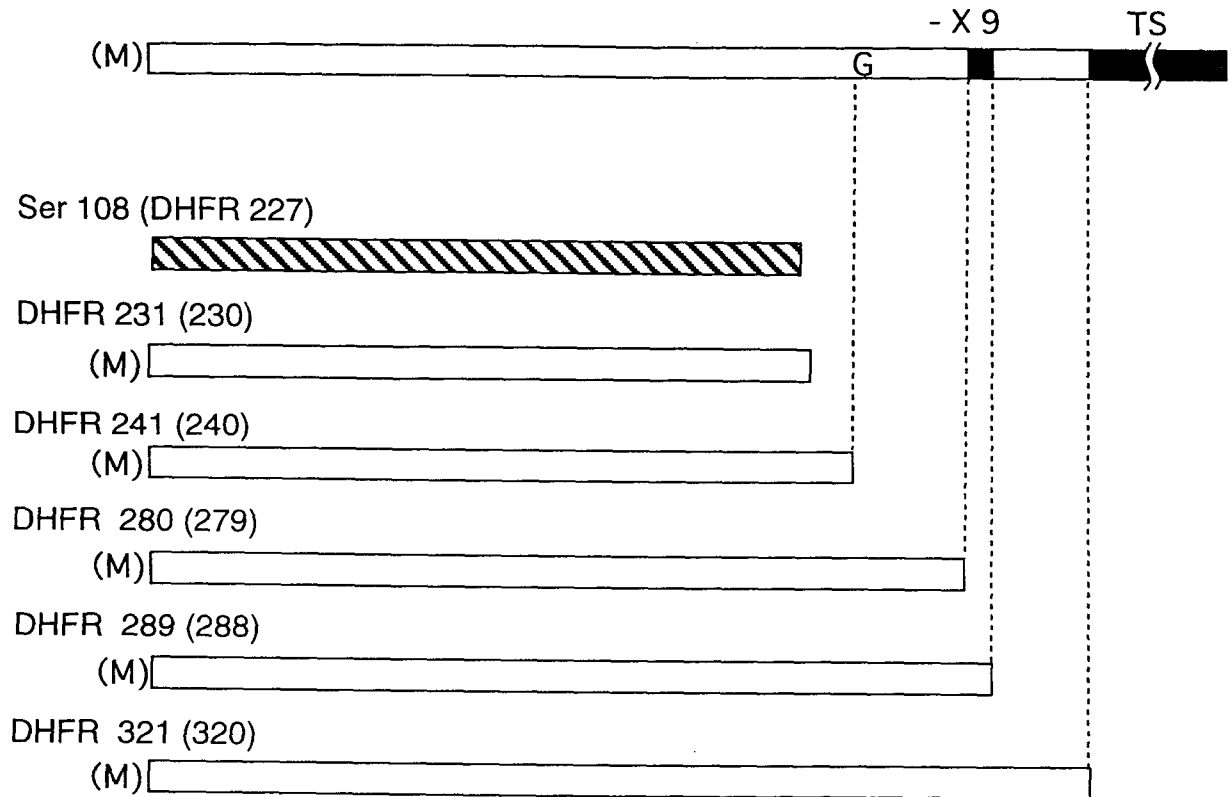


図1-19 熱帯熱マラリアDHFR遺伝子末端伸長の概念図
 再構築したマラリア遺伝子はN末端についてはメチオニンの付加で、C末端については5段階に置いて伸長し（結果参照）計11種のDHFR遺伝子が構築した。新たに構築された遺伝子はpET-3a発現ベクターに挿入し、遺伝子発現に用いた。

される。つまり DHFR の構造的、機能的に必要な部分はこの上流に存在していると考えられたため、この位置に C 末端を設定した（アミノ酸数 280: DHFR 280, 図 1-19）。

7) 上記の遺伝子と同じ C 末端を持ち、N 末端のメチオニンが 1 つのもの（アミノ酸数 279: DHFR 279, 図 1-19）。

8) C 末端をアミノ酸にして 61 残基多いところに C 末端を設定し、N 末端を 1 つだけ伸ばしてあるもの。これは - にチャージした部分の直後で切ったものである。この理由として、- のアミノ酸が 9 つも連なっていることより、この部分構造的または機能的に何らかの役割を果たしているのではないかと考えられたのである（アミノ酸数 289: DHFR 289, 図 1-19）。

9) C 末端を 61 残基伸ばし、N 末端のメチオニンが 1 つのもの（アミノ酸数 288: DHFR 288, 図 1-19）。

10) C 末端を 93 残基伸ばし、N 末端を 1 つだけ伸ばしてあるもの。これは TS 部分の直前で切ったものである。その理由としてここまで伸ばせば DHFR 部分が欠けることはあり得ないということと、junction 部分によって DHFR 部分が構造的に安定しているという可能性も考えられたためである（アミノ酸数 321: DHFR 321, 図 1-19）。

11) C 末端を 93 残基伸ばし、N 末端のメチオニンが 1 つのもの（アミノ酸数 320: DHFR 320, 図 1-19）。

これらの遺伝子は 図 1-15 に示してあるように PCR 法を用いて熱帯熱マラリア原虫の DHFR-TS 遺伝子の cDNA と構築したレコンビナント DHFR 遺伝子より作り、発現ベクター pET-3a にクローニングした。

レコンビナント DHFR の誘発

図 1-19 に示した 11 個の遺伝子をお腹菌において誘発した。遺伝子の誘発系はこれまでの実験で使用してきた、T7 フェージの DNA ポリメラーゼを用いた系である。遺伝子を誘発してみた結果、SDS ゲルで判別できるほど発現したのは DHFR 230、DHFR 231、DHFR 240、DHFR 241、DHFR 288、DHFR 289、それとメチオニンが 2 つの DHFR 228 の計 7 つであった（図 1-20）。残る 4 つである DHFR 279、DHFR 280、DHFR 320、DHFR 321 が誘発されなかった理由は不明である。

レコンビナント DHFR の生化学的解析

誘発に成功した 7 つの DHFR のうち、DHFR 227, 228, 230, 231, 289 の 5 つについて単離精製と生化学的な解析を新たに行った。精製の方法はこれまで行ってきた実験と同じ方法に依るものである。表 1-4 にまとめてあるように、これまでの実験に用いたレコンビナント DHFR (DHFR 227) のジヒドロ葉酸と NADPH に対するミカエリス定数 K_m が $66.6 \mu\text{M}$ と $90.2 \mu\text{M}$ 、酵素 1 分子が一分間に触媒

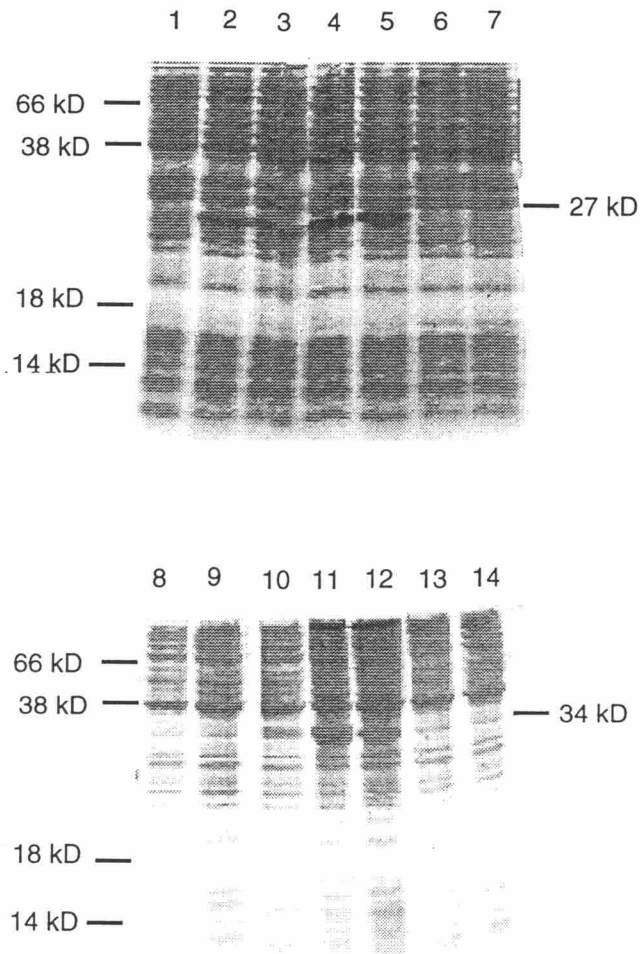


図1-20 マラリアDHFRのSDSゲル電気泳動

大腸菌において発現された各DHFRを12.5%のSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。Lane 1: マラリアDHFR非誘発大腸菌, Lane 2: マラリアDHFR 227誘発大腸菌, Lane 3: マラリアDHFR 228誘発大腸菌, Lane 4: マラリアDHFR 230誘発大腸菌, Lane 5: マラリアDHFR 231誘発大腸菌, Lane 6: マラリアDHFR 240誘発大腸菌, Lane 7: マラリアDHFR 241誘発大腸菌, Lane 8: マラリアDHFR非誘発大腸菌, Lane 9: マラリアDHFR 279誘発大腸菌, Lane 10: マラリアDHFR 280誘発大腸菌, Lane 11: マラリアDHFR 288誘発大腸菌, Lane 12: マラリアDHFR 289誘発大腸菌, Lane 13: マラリアDHFR 320誘発大腸菌, Lane 14: マラリアDHFR 321誘発大腸菌を示す。左に示した分子量は分子量マーカーによって定めた。

Reconstructed <i>P. f.</i> DHFR							
	(227)	(228)	(230)	(231)	(289)	(S 108) [§]	(3D7)
kcat (1/sec)	13.1 ± 1.1	12.2 ± 0.8	0	73.0	110.5	88.4 ± 6.3 [§]	75.7 ± 11 [*]
Km ^{DHF} (μM)	66.6 ± 2.6	62.3 ± 2.6	—	4.3	41.1	12.9 ± 4.9 [§]	3.2 ± 0.6 [*]
Km ^{NADPH} (μM)	90.2 ± 4.3	—	—	12.2	79.8	4.7 ± 1.3 [§]	4.5 ± 0.5 [*]

* : Zolg.J.W. , *et al* (1987)

* : Guo-Xian.C., and Zolg.J.W., (1988)

§ : Sirawaraporn.W., *et al* (1993)

表1-4 DHFR酵素活性の比較

N,C末端を伸長したレコンビナントDHFR遺伝子を用いて調製した5種類のレコンビナントマラリアDHFR 227, 228, 230, 231, 289 と、マラリア原虫より精製したDHFR-TS (3D7)、ウシDHFR、別のグループによって再構築されたマラリアDHFR遺伝子と大腸菌を用いて調製されたレコンビナントマラリアDHFR (108S) の酵素活性をまとめた。

する基質分子の数、 k_{cat} が 13.5 1/sec , であった。DHFR 227 のN末をアミノ酸で一つだけ伸ばしたDHFR 228 についてはジヒドロ葉酸DHF 対にするミカエリス定数 K_m と k_{cat} について測定し、それぞれの値が $62.3 \mu\text{M}$ と 12.3 1/sec であった。DHFR 227 のC末を3つ伸ばしたDHFR 230 については様々な方法で再活性を試みたが、DHFR 活性は検出できなかった (Data not shown)。N末を1つ、C末を3つ伸ばしたDHFR 231 ではDHF と NADPH に対する K_m が $4.3 \mu\text{M}$ と $12.2 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} が 73.0 1/sec , であった。289 ではDHF と NADPH に対する K_m が $110.5 \mu\text{M}$ と $41.1 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} が 110.5 1/sec であった (表 1-4)。酵素活性を測定したレコンビナントDHFRの中で、マラリア原虫のDHFR に最も近い酵素活性を示したのはDHFR 231 であった。

考察

熱帯熱マラリアのDHFR-TS遺伝子のうち、DHFR部分をコードすると考えた範囲を12種設定し、それらの塩基配列を合成遺伝子とPCR法を用いて構築し、大腸菌において誘発したところ、その内8種が発現され、その内6種を精製、酵素活性を測定した。このうち231個のアミノ酸によって構成されるDHFR231がマラリア原虫より精製されたDHFR-TSの酵素活性に非常に近い酵素活性を示した。6種の分子量の異なるマラリアDHFRの K_m, k_{cat} を比較すると、その数値によって4つのグループに分けられる。まずDHFR227とDHFR228で、これら2つはネイティブのDHFR-TSと比べ、 K_m, K_{cat} 共に異なった値を示す。次にDHFR230で、これは様々な方法で再活性化を試みたが、DHFR活性は検出されなかった。もう一つはDHFR231で、これはネイティブのDHFR-TSと殆ど同じ酵素活性を持っている。最後のDHFR288で、 k_{cat} はネイティブのDHFR-TSと殆ど同じであるが、 K_m はかなり異なった値を示した。

DHFR227とDHFR228はN末端のメチオニンが1つ多いだけの違いしか無く、 K_m, K_{cat} 共に殆ど同じ値を示した。一方N末のメチオニンが1つ違うだけのDHFR230とDHFR231は後者がネイティブのDHFR-TSと殆ど同じ酵素活性を持っているのに比べ前者は活性が全く検出されなかった。大量発現に成功したレコンビナントDHFRの活性化は、0-6 M UREA と 0-4 M 塩酸グアニジンによって重合したレコンビナントDHFRを可溶化し、その後徐々に薄めてイオン強度を下げるという方法で行われた。DHFR230においては重合したDHFRの可溶化には成功したが、DHFR活性は検出できなかった。

活性が検出されなかった理由としてはN, C末端の相互作用によるものとしか考えられない。これを支持する事象として、マラリア原虫と同じ寄生原虫である *Leishmania major* のDHFR-TSのX線結晶解析結果がある。それによるとDHFR-TSのDHFR部分におけるN末端とC末端は立体構造的に極めて近い位置に存在することが明らかになっている (Knighton, D.R., *et al* 1994)。また原核、真核生物を問わず他の生物種においても、それら生物種が持つDHFRのX線結晶解析の結果はやはりDHFRのN末とC末が近いことを示している (Bolin, J.T., *et al* 1982, Voltz, K.W., *et al* 1982)。立体構造的に近い位置にあるN末端に位置する2つのメチオニンとC末端に位置するスレオニンと2つのアスパラギンが何らかの相互作用をし、そのためDHFR230では酵素活性が検出されなかったものと考えられる。

DHFR289はDHFR231に比べ k_{cat} はほとんど変わらないが、基質であるジヒドロ葉酸とNADPHとの結合が弱くなっている。この変化も現時点ではC末端が伸びたということ以外にはっきりとした理由は考えられない。DHFR289のC末端に存在する9つの連続した-にチャージするアミノ酸の影響によるものか、それとも伸ばしすぎたC末端によるものかは9つの-チャージのアミノ酸を持たないD

HFR280 との酵素活性の比較によってある程度は見当がつくが、DHFR280は大腸菌において大量発現しなかったために酵素活性の比較はできなかった。

今回調製したDHFR231はマラリア原虫の持つDHFR-TSの非常に近い酵素活性を示した。構築した発現系は大腸菌を使った系なので大量に発現できるため、マラリア原虫より精製する方法とは比較にならないほどの大量の酵素を一度の精製で調製できる。このことによって大量の酵素を必要とするX線結晶解析やNMR等による3次元構造解析が可能になり、コンピュータドラッグデザインによる抗マラリア剤の開発が可能になるかもしれない。

参考文献

- Baker.B.R., and.,Jordaan J.H., 1965 *J.Pharm.Sci.* **54**, 1740-1745.
- Banyal.H.S., and Inselberg.J., 1985 *Plasmodium falciparum*, Selection and characterization of Pyrimethamine-resistant Mutants
- Bolin.J.T.,Filman.D.J.,Matthews.D.A.,Hamlin.R.C.,and Krayt.J., 1982, Crystal structure of *Escherichia coli* and *Lactbacillus casei* Dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry* **257** 13650-13662
- Bolton.E.T., and McCarthy. B.J., 1962. A general methods for the isolation of complementary to DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **48**: 930-
- Bzik.D.J.,Li.W.,Horii.T.,Inselberg.J., 1987 Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidilate syntase gene *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.***84** 8360-8364
- Coderre.J.A.,Beverley.S.M.,Schimke.R.T.,Santi.D.V., Overproduction of a bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **80** 2132-2136
- Cowman.A.F.,Lew.A.M., 1990 Chromosomal rearrangements and point mutations in the DHFR-TS gene of *Plasmodium chabaudi* under antifolate selection *Mol.Biochem.Parasitol.* **42** 21-30
- Cowman.A.F.,Morry.M.J.,Biggs.B.A.,Cross.G.A.M.,Foote.S.J., 1988 Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidilate syntase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **85** 9109-9113
- Crea.R.,Kraszewski.A.,Hirose.T.,Itakura.K., 1978 *Proc.Natl.Sci.USA* **75** 5765-
- Dickman.A,Jung.A 1986 The mechanism of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol.* **93** 275-278
- Edge.M.D.,Greene.A.R.,Heathcliff.G.R.,Meacock.P.A.,Schuch.W.,Scanlon.D.B.,Atkinson.T.C.,Newton.C.R., Markham.A.F., 1981 *Nature* **292** 756-
- Ellis.R.J., Molecular Chaperones 1991 *Ann.REv.Biochem.***60** 321-347
- Garvey.E.P.,Santi.D.V., 1985 Limited proteolysis of the bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase from *Leishmania tropica* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.***82** 7188-7192

- Guo-Xian.C.,Mueller.C.,Wendlinger.M.,Zolg.J.W., 1987 Kinetic and Molecular properties of the dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant clones of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Mol.Pharmacol.***31** 430-437
- Guo-Xian.C.,Zolg.W., 1987 Purification of bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase complex from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Mol.Pharmacol.***32** 723-730
- Hall.S.J.,Sims.P.F.G.,Hyde.J.E., 1991 Functional expression of the dihydrofolate reductase and thymidilate syntase activities of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Mol.Biochem.Parasitol.***45** 317-330
- Hillcoat.B.L.,Nixon.P.F.,and,Blackley.R.L., 1967 Effect of substrate decomposition on the spectrophotometric assay of dihydroreductase. *Anal.Biochem* **21** 178-180
- Inselburg.J.,Bzik.D.J.,and Li.W-B., 1987 *Plasmodium falciparum*: Three amino acid changes in the dihydrofolate reductase of a pyrimethamine resistant mutant. *Expl Parasitol.***67** 361-363
- Inselburg.J.,Bzik.D.J.,and Horii.T., 1987 Pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum* overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication *Mol.Biochem.Parasitol.***26** 121-134
- Inselburg.J.,Zhang.R.D., 1988 Study of dihydrofolate reductase thymidilate syntase in *Plasmodium falciparum* *Am J.Med Hyg* **39** 328-336
- Itakura.K.,Hirose.T.,Crea.T.,Riggs.A.D.,Heyneker.H.L.,Boliver.F., and Boyer.H.W., 1977 *Science* **198** 1056-
- Kan.S.C.,Siddiqui.W.A., 1979 Comparative studies on dihydrofolate reductase from *Plasmodium falciparum* *J.Protozool.***26** 660-664
- Knighton.D.R., Chen-Chen Kan, Howerd.E.,Janson.C. A.,Hostomska.Z., Katherine M.Welsh and David A.Mattews . 1994 Structure of and kinetic channeling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidilate syntase. *Nature structural biology* No,1 Vol,3 186-194
- Kumar.S.,Miller.L.H.,Quakyi.I.A.,Keiser.D.B.,Houghten.R.A.,Maloy.W.L., Moss.B.,Berzofsky.J.A.,Good.M.F., 1988 Cytotoxic T cells Specific for the Circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* *Nature* **334** 258-260

- Lazar.G.,Zhang.H ., and Howard M.G., 1993 The origin of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidilate syntase isogenes of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* vol 3 No,5 657-668
- Lockyer.M.J.,Marsh.K.,Newbold.C.I., 1989 Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein *Mol.Biochem.Parasitol.***37** 275-280
- McBride.J.S.,Newbold.C.I.,Anand.R., 1985 Polymorphism of a high molecular weight shizont antigen of the human mararia parasite *Plasmodium falciparum* *J.Exp.Med* **161** 160-180
- McCutchan.J.A.,Welsh.J.B.,Dame.I.A.,Quakyi.P.M.,GravesJ.C.,Drake.C.J., 1984 Mechanism of Pyrimethamine resistance in recent isolates of *Plasmodium falciparum*. *Antimicro.Agent.Chemotherapy***26**.656-659
- Meek.T.D.,Gervey.E.D.,Santi.D.V., 1985 Pulification and characterization of the bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase from Methotrexate-resistant *Leishmania tropica* *Biochemistry* **24** 678-686
- Morimatsu.K., Ogawa.H., and Horii.T.,1995 Analysis of the DNA binding site of Escherichia coli Rec A protein. *Adv.Biophys.*)
- Papadopoulou.B,Roy.G.,Ouellette.M., 1992 A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania* *EMBO* 11 3601-3608
- Pattanakitsakul.S.,Ruenwongsa.P., 1984 Characterization of thymidilate syntase and dihydrofolate reductase from *Plasmodium berghei* *Int.J.Parasitol* **14** 513-520
- Peterson.D.S.,Walliker.D.,Wellems.T.E., 1988 Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidilate syntase confers resistance to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.***85** 9114-9118
- Peterson.D.S.,Milhous.W.K.,Wellems.T.E., 1990 Molecular basis of differential resistance to cycroguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.***87** 3018-3022
- Reche P; Arrebola R; Olmo A; Santi DV; Gonzalez-Pacanowska D; Ruiz-Perez LM 1994 Cloning and expression of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Trypanosoma cruzi*.*Mol Biochem Parasitol* **65**: 247-58
- Richardson.J., 1981 *Adv.Prot.Chem.* **34**: 174-175

- Sirawaraporn.W.,Yuthavong.Y., 1984 Kinetic and Molecular properties of dihydrofolate reductase from pyrimethamine sensitive and pyrimethamine resistant *Plasmodium chabaudi* *Mol.Biochem.Parasitol.***10** 355-367
- Sirawaraporn.W.,Yuthavong.Y., 1986 Potentiating effect of pyrimethamine and sulfadoxine against dihydrofolate reductase from pyrimethamine sensitive and pyrimethamine resistant *Plasmodium chabaudi* *Antimicrob.Agents Chemother.***29** 899-905
- Sirawaraporn.W.,Sirawaraporn.R.,Cowman.A.F.,Yuthavong.Y.,Santy.D.V., 1990 Heterologous expression of active thymidilate synthase-dihydrofolate reductase from *Plasmodium falciparum* *Biochemistry.***29** 10779-10789
- Tanabe.K.,Mackay.M.,Goman.M.,Scaife.J.G., 1987 Allelic Dimorphism in a Surface Antigen Gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* *J.Mol.Biol* **195** 273-287
- Tanaka.M.,Hao-Ming.Gu.,Bzik.D.J.,Wu-Bo.L.,Inselberg.J.W., 1990 (a) Dihydrofolate reductase mutants and chromosomal changes associated with pyrimethamine resistance of *Plasmodium falciparum* *Mol.Biochem.Parasitol.***39** 127-134
- Tanaka.M.,Hao-Ming.Gu.,Bzik.D.J.,Wu-Bo.L.,Inselberg.J.W., 1990 (b) Mutant dihydrofolate reductase genes in pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum* with polymorphic chromosome disruptions *Mol.Biochem.Parasitol.***42** 83-92
- Tartof.K.D., and Hodds.C.A., 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab.Focus* **9**: 12-
- Thaithong.S.,Chan.S.,Songsomboon.S.,Wilairat.P.,Seesod.N.,Sueblinwong.T.,Goman.M.,Ridley.R.,Beale.G., 1992 Pyrimethamine resistant mutations in *Plasmodium falciparum* *Mol.Biochem.Parasitol.***52** 149-158
- UNDP / World Bank / WHO, 1992 Tropical Disease Research : *Eight programme report*, 191.
- Volz.K.W.,Matthews.D.A.,Alden.R.A.,Freer.S.T.,Hansch.C.,Kaufman.B.T., and Kraut.J., 1982, Crystal structure of Avian Dihydrofolate reductase Containing Phenyltriazine and NADPH. *The Journal of Biological Chemistry.* **257** 2528-2536
- Wada.K.,Aota.S.,Tsuchiya.R.,Ishibasi.F.,Gojobori.T.,Ikemura.T., 1990 Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data *Nucl.Acids Res.***18** 2367-2411

- Walter.R.D., 1986 Altered dihydrofolate reductase in pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum* *Mol.Biochem.Parasitol.***19** 61-66
- Washtien.W.L,Gruumont.R,Santi.D.V., 1985 DNA amplification in antifolate-resistant *Leishmania* *J.Biol.Chem.***260** 7809-7812
- Zolg.J.W.,Chen.G.X.,Plitt.J.R., 1990 Detection of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation-specific polymerase chain reaction *Mol.Biochem.Parasitol.***257-266**

第二章

薬剤耐性型熱帯熱マラリアDHFRの 生化学的解析

要旨

合成DNAによって構築した薬剤感受性型のマラリアDHFR遺伝子に16, 51, 59, 108位のアミノ酸変異に対応する点突然変異を導入し、シクログアニル耐性型マラリア原虫株とピリメサミン耐性型原虫株の持つDHFRと同じアミノ酸配列を持つ4種類の薬剤耐性株由来のDHFR遺伝子(DHFR Val 16 Thr 108, DHFR Asn 108, DHFR Ile 51 Asn 108, DHFR Arg 59 Asn 108)を作成した。4種類の薬剤耐性型DHFRを精製し、抗マラリア剤に対する親和性を調べ、薬剤感受性型DHFRと比較したところ、シクログアニル耐性型DHFRはシクログアニルに対し、ピリメサミン耐性型DHFRはピリメサミンに対し、低い親和性を示した。次にシクログアニル耐性型マラリア原虫株とピリメサミン耐性型原虫株、薬剤感受性型原虫株を用い、各薬剤について増殖阻害実験を行った。その結果、薬剤感受性型原虫株に比べ、シクログアニル耐性型原虫株はシクログアニルに対し、ピリメサミン耐性型原虫株はピリメサミンに対して強い耐性を示し、生化学的な解析結果と培養系における解析結果との間に相関関係を示した。以上の結果は点突然変異に起因する薬剤と標的酵素との親和性の低下が熱帯熱マラリア原虫のDHFR阻害剤に対する耐性機構に大きく関与することを強く示すものである。またこれまで得られてきた他の生物種のDHFR立体構造と今回得た*in vitro*の実験系における結果より薬剤に対する耐性機構について論ずる。

序説

ピリメサミンとプログアニル (図 -2) はそれまで毒性大腸菌のDHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) を標的にした抗菌剤として使用されてきたトリメトプリム (図 -2) の化学構造を参考に開発されたDHFR阻害剤で、プログアニルは第二次大戦直後に、ピリメサミンは少し遅れて1952年に抗マラリア剤として一般に使われ初めた。プログアニルは生体内でシクログアニル (図 -2) と呼ばれる化合物に代謝変化し、ピリメサミンと極めて良く似た化学構造をとる。どちらの化合物も人体に対する毒性は低く、正しい処方箋に従えば副作用は全く無いという薬剤で、そのうえピリメサミンは体外に排泄される速度が非常に遅く、服用する回数も少なく済むものであった (Bruce-Chwatt.L.J., 1985)。しかし1950年代の半ばには早くも薬剤耐性型マラリア原虫が世界中から報告され始め、時を経ずに世界中に広まっていった。その後ピリメサミンはジヒドロ葉酸の合成系に働くジヒドロプロテロイン酸合成酵素(Dihydropteroic acid syntase)とジヒドロ葉酸合成酵素(Dihydrofolic acid syntase)を阻害するサルファ剤(Sulfoine)と共に合剤として使われたが、これに対する耐性株もすでに東南アジアや南アメリカ、それにアフリカの一部で報告されている。

ピリメサミンやプログアニルはマラリア原虫のDHFRを標的にしている。これらは多くの抗マラリア剤のうち、唯一標的に解っている薬剤でもある。一般に生物が薬剤に対し耐性を持つときは薬剤に対する分解または修飾による不活性化、薬剤の標的の量的、質的变化、細胞膜における透過機構の変化に大別される。ピリメサミンやプログアニルに対し耐性を持つ熱帯熱マラリア原虫について耐性機構に関する解析が進んでおり、細胞膜における透過機構については¹⁴Cによって標識したピリメサミンによって調べられた。培養系において原虫細胞中における¹⁴Cの蓄積量を解析したところ、薬剤耐性型マラリア原虫と感受性型とでは殆ど変わらないことが示され (Dickman.A.,and Jung.A., 1986)、耐性の原因は細胞膜における透過性の変化には依らないことが示唆されている。また標的酵素の量的変化については罹患地域より単離した耐性株について解析されている。それによると薬剤耐性型と感受性型マラリア原虫でDHFR-TS遺伝子の数はどちらも1つの遺伝子しかコードしていないことが示され (Cowman.A.F., et al 1988, Peterson.D.S., et al 1988, Foote.S.J., et al 1990, Peterson.D.S., et al 1990)、マラリア原虫が獲得した耐性機構は遺伝子重複にも依らないことが示された。以上の報告に前後して、薬剤耐性株の遺伝子解析結果と培養系における薬剤耐性の選択性とその度合いに相関関係があることを示す結果が相次いで報告された。単離された耐性株のDHFR-TS遺伝子を解析すると、特定の位置に点突然変異を持っている事が明らかになり、その結果と培養系によって調べた薬剤に対する選択性とその度合いを照らし合わせると、DHFR阻害剤に対し耐性を獲得した熱帯熱マラリア原虫は大きく3つのグループに分けられる事が判明した (表 2-1)。1つのグループは108番目のアミノ酸が Thr に変わったもので主にシクログアニルに対する耐性が強いもの (例、It.G2.F6株:表 2-1, Cowman.A.F., et al 1988)。もう一

Strain	ID50 (ng/ml)		Amino acid alterations					Reference
	Pyr	Cyc	16	51	59	108	164	
3D7	0.7	0.7	Ala	Asn	Cys	Ser	Ile	1,2,4,7
It.G2.F6	70	180	Val	—	—	Thr	—	2,8,7
HB3	730	15	—	—	—	Asn	—	1,2,4,8,7
It.D12	2900	80	—	Ile	—	Asn	—	2,8
7G8	2091	14	—	—	Arg	Asn	—	6,3
W2	1100	23	—	Ile	Arg	Asn	—	1,4
V1/S	2800	800	—	Ile	Arg	Asn	Leu	4,5

- (1) A.F.Cowman., *et al* 1988 (2) D.S.Peterson., *et al* 1988
(3) V.A.Snewin., *et al* 1989 (4) J.W.Zolg., *et al* 1989
(5) Tanaka.M., *et al* 1990 (6) S.J.Foote., *et al* 1990
(7) D.S.Peyerson., *et al* 1990

表 2-1 熱帯熱マラリアのDHFRにおける部位特異的変異と薬剤に対する耐性の強さ薬剤耐性の強さはマラリアを培養している培地に抗マラリア剤(ピリメサミン: Pyr, シクログアニル: Cyc)を入れ、50%のマラリアが死滅するときの濃度(50%致死濃度: ID50 (ng/ml))で示している。

一つのグループは108番目がAsnに変わり、変異アミノ酸の数が1-3つまでのもので主にピリメサミンに対する耐性が強いもの(例、HB3, It.D12, 7G8, W2株:表2-1, Peterson.D.S., *et al* 1988, Foote.S.J., *et al* 1990)、最後のグループが108番目がAsnに変わり、変異アミノ酸の数が4つあるもの(例、V1/S株:表2-1, Cowman.A.F., *et al* 1988)でこれはシクログアニルとピリメサミンの両方に対し、強力な耐性を獲得している。熱帯熱マラリアDHFR-TS遺伝子の解析と前後して一部の遺伝子解析のなされていない薬剤耐性のマラリア原虫株からごく微量ながら直接DHFR-TSが精製され、生化学的な解析がなされた(Walter.R.D., 1986, Guo-Xian.C., 1987a, Guo-Xian.C., *et al* 1987b)。その結果は耐性が強い株から得られたDHFR-TSほど薬剤に弱い親和性を示すというものであった。

以上の知見より熱帯熱マラリア原虫がDHFR阻害剤に対して獲得した耐性の機構はマラリアDHFR遺伝子上に生じた点突然変異による可能性が示唆されるが、アミノ酸変異の位置と照らし合わせた酵素レベルでの詳細な解析は未だなされていない。そこで本章では熱帯熱マラリア原虫の薬剤耐性機構を解明する目的で第一章で構築したマラリアDHFRを大量に調製する系をもとに薬剤感受性型マラリアDHFRの遺伝子に部位特異的 point mutation を加え、薬剤耐性型マラリアDHFRの遺伝子を作成した。それを用いて薬剤耐性型マラリアDHFRを大量に調製し、酵素学的解析を行った。またその結果と比較するため、解析を行った薬剤耐性型DHFRと同じアミノ酸配列のDHFRを持つマラリア原虫株を使って培養系において増殖阻害実験を行いその耐性度を酵素学的解析結果と比較した。

材料と方法

菌株と培地

本研究で使用した大腸菌は、部位特異的突然変異の導入には *rec A* 遺伝子欠損株の大腸菌 AK 101 株 (Horii.T., *et al* 1992) を、薬剤耐性型マラリア DHFR 遺伝子の作成用には TG-1 株 (Messing.J., *et al* 1983) を使用した。薬剤耐性型 DHFR 蛋白質の発現には BL21(DE-3) Lys-S (Studier.F.W., *et al* 1990) を使用した。バクテリオファージは点突然変異導入用と DNA の塩基配列決定用に M13-mp18 (Perron.Y., *et al* 1985) と M13-mp19 (Norrander.J., *et al* 1983) を使用した。プラスミドは発現ベクターとして pET-3a (Studier.F.W., *et al* 1990) を使用した。大腸菌の培養には L-broth と Terrific -broth (Tartof.K.D., and Hodds.C.A., 1987.) を使用した。

薬剤耐性型 DHFR 遺伝子の構築

部位特異的突然変異導入用に用いたオリゴヌクレオチドは Milli Gen / Bioreserch 社の Cyclone Plus DNA Synthesuizer で合成した。塩基配列は以下に示すとうりである。

N 51 I 変異 (51Asn → 51Ile) 5' -CCGTGGAAATGCATCTCATTGGATATG- 3'

C 59 R 変異 (59Cyc → 59Arg) 5' -GAAGTACTTTTCGTGCGGTGACCACG- 3'

S 108 N 変異 (108Ser → 108Thr) 5' -GGGCCGCACGAATTGGGAATCAATC- 3'

部位特異的突然変異の導入には、バクテリオファージ M-13 *P.f.* DHFR 231 を鋳型として用いた。これはマラリア DHFR 231 遺伝子を持つ pET-3a *P.f.* DHFR 231 よりマラリア DHFR 231 遺伝子の全塩基配列を含む断片を *Sph* I と *Bam* H I で切り出し、M-13 mp18 の *Sph* I と *Bam* H I 部位に導入したものである。部位特異的突然変異の導入には Nakamae と Eckstein の方法に従い (Nakamae. K. L., F.Eckstein, 1986)、突然変異の導入後、ジデオキシ法に従って塩基配列を確認した (Sanger.F., *et al* 1977, Tabor.S., and Richardson.C., 1987)。尚 A 16 V 変異 (16Ala → 16Val) と S 108 T 変異 (108 Ser → 108 Thr) は薬剤感受性型 DHFR 遺伝子を構築したときに得た (第一章、データ未掲載) のでそれを用いた。各種レコンビナント DHFR 構築のためにバクテリオファージ M-13 において部位特異的突然変異を導入したマラリア DHFR 遺伝子を、A 16 V 変異は *Nde* I 部位と *Stu* I 部位で切り出し、発現ベクター pET-3a *P.f.* DHFR 231 の *Nde* I 部位と *Stu* I 部位に導入した。S 108 T 変異と S 108 N 変異は *Pst* I 部位と *Avr* II 部位を、N 51 I 変異と C 59 R 変異は *Stu* I 部位と *Sca* I 部位を使ってそれぞれ pET-3a *P.f.* DHFR 231 に導入した (図 1-2)。構築した 4 種類の薬剤耐性型マラリア DHFR 遺伝子は以下のよう

Ala 16 Val, Ser 108 Thr, -----pET-3a DHFR231 V16 T108
Ser 108 Asn, -----pET-3a DHFR231 N 108
Asn 51 Ile, Ser 108 Asn -----pET-3a DHFR231 I 51 N108
Cys 59 Arg, Ser 108 Asn-----pET-3a DHFR231 R 59 N108

レコンビナントDHFRの誘発

構築した薬剤耐性型マラリア DHFR 遺伝子は大腸菌 BL21(DE-3) Lys-S (Studier.F.W., *et al* 1990) を用いて発現させた。薬剤耐性型マラリアDHFR 遺伝子の入った pET-3a プラスミドをカルシウム法によって大腸菌 BL21(DE-3) Lys-S に入れ、アンピシリン、クロラムフェニコールを含むL プレートで選択する。この大腸菌を 1.5 L ずつ4本に分けた LB 培地 6 L において 37 °C で2時間半ほど震とう培養し、 1×10^8 cells / ml まで増殖させた。そこで IPTG を終濃度で 50 μ g / ml になるように加え、以後2時間震とう培養した。その後 8000 rpm で20分遠心して菌体を集めた。遠心は4°Cで行った。6 L の培地から約10 g の菌体が取れた。集めた菌体は-80°Cで保存した。

レコンビナントDHFRの精製

薬剤耐性型マラリアDHFRの精製は第一章の方法に従った。

薬剤耐性型マラリアDHFRの活性測定

薬剤耐性型DHFRの Km、kcat を測定する方法は第一章の反応条件(2)と同様の方法に従った。薬剤耐性型マラリアDHFRのピリメサミン、シクログアニルに対する IC₅₀ を求めるときは反応条件(2)において、反応系のピリメサミンを 0-2000 nM の範囲で、シクログアニルを 0-20000 nM の範囲で変化させ、反応速度を出した。反応速度とその時のDHFR阻害剤の濃度をsemi-logarism プロットにあてはめ、反応速度が 1/2 になる濃度を IC₅₀ とした。

マラリア原虫の培養と増殖阻害実験

増殖阻害実験に使用した熱帯熱マラリア原虫は薬剤耐性型マラリア原虫として 3D7 株 (Walliker. D., *et al* 1987) を、薬剤耐性型として FCR3 株 (Targer.W., *et al* 1981) と K1 株 (Knowies.G., *et al* 1982) を使用した。熱帯熱マラリア原虫は通常 Targer and Jansen 法 (Targer.W., and Jansen.J.B., 1976) と Inselburg and Banyal 法 (Inselburg.J., and Banyal.H.S., 1984) で以下のように継代した。φ = 50 または 100 mm の培養皿に赤血球容積比が 5% になるように新鮮な赤血球を加え、キャンドルジャーにおいて 37 °C で、K1 株の場合は 37.5 °C で培養した。培養液は毎日交換し、赤血球は 3-4 日ごとに加える。マラリア原虫の増殖はギムザ染色で測定する。培地は para-amino benzoic acid や葉酸の含まれていない RPM1 1640 (Gibco BRL, Grand Island N.Y.) 培地を使用した。RPM1 1640

完全培地を濾過滅菌した後、マラリア原虫の培養に使用した。

増殖阻害実験の場合には主に輪状体に同調したマラリア原虫カルチャー（赤血球の寄生率 5.5 %、赤血球容積比が 2 - 5 %）を RPM1 1640 完全培地により、赤血球の寄生率 0.5 - 1 %、赤血球容積比が 2 % にする。これらを 100 μ l ずつ 96 穴プレート (Corning glass works, Corning, N.Y.) に分注し、適当な濃度の DHFR 阻害剤を加えた後に培養する。その後毎日 DHFR 阻害剤を加えた培地を交換し、72 時間後にマラリア原虫の増殖をギムザ染色によって観測した。

RPM1 1640 完全培地 ; 0.2 % NaHCO₃, 50 mg / ml hypoxanthine, 500 mg / l L-glutamate, 25 mg / l ゲンタマイシン、100,000 u / l ペニシリン、100 mg / l ストレプトマイシン、10 % (v/v) ヒト血清（3 D 7 株では A 型、FCR 3 株と K 1 株の場合は O 型）

結果

薬剤耐性型マラリアDHFR遺伝子の構築、ならびに蛋白の発現と単離精製

ピリメサミンやプログアニル（シクログアニル）（図 1-1）に対し耐性を持つマラリア原虫は世界各地で報告されている。それらの罹患地域より単離された耐性株の解析によりそれらの耐性株はDHFR遺伝子上の特定の位置に点突然変異を持っている事が明らかになっている（Cowman.A.F., *et al* 1988, Peterson.D.S., *et al* 1988, Inselburg.J., *et al* 1988, Snewin.V.A., *et al* 1989, Zolg.J.W., *et al* 1989, Foote.S.J., *et al* 1990, Peterson. D.S., *et al* 1990, 表 2-1）。耐性型のDHFR遺伝子の構築は、これまでに報告されてきた培養系における各薬剤に対する耐性度を指標にし、その耐性株が持つDHFRと同じアミノ酸配列を持つように遺伝子を構築した。

構築した薬剤耐性型マラリアDHFR遺伝子は当初感受性型DHFRと同じpKM-2を使った発現系を用いて誘発させたが、SDS ゲル電気泳動によって調べたところ、いずれの耐性型DHFRもほとんど発現しなかった。そこで同じ T7 RNAPolymerase によって発現を制御する大腸菌BL21 (DE3) Lys-S 株を用いる系（Studier.F.W., *et al.* 1990）を試みたところ、SDS ゲル電気泳動において予想した分子量である約 27000 Daの部分に大量の蛋白質が誘発していることを確認した。発現量はpKM-2を使った誘発系の場合より幾分減少した（10-15% / total protein）が、蛋白の誘発系として問題はないのでこの発現系を以降の実験に用いた。レコンビナントDHFRを誘発した大腸菌BL21 (DE3) Lys-S 株の細胞を破壊した後に遠心し、SDS ゲル電気泳動によって調べたところ、大部分のレコンビナントDHFRは沈殿分画に存在し、薬剤感受性型DHFRと同じように重合状態で発現されていることが判明した。

大腸菌BL21 (DE3) Lys-S株において誘発した薬剤耐性型レコンビナントDHFRは、いずれも感受性型DHFRと同様に大腸菌細胞中で凝集して活性のない状態で存在していたので、薬剤感受性型DHFRと同様の方法で再活性化したところ、DHFR活性が出たのでそれ以降の精製も感受性型DHFRと同様の方法で行った。再活性化した薬剤耐性型レコンビナントDHFRをヒドロキシアパタイトカラムとS-300ゲルフィルトレーションを用いて精製したところ、約 98% の純度の蛋白質を約 10 mg 精製することができた。

薬剤耐性型マラリアDHFRの生化学的解析

4種類の突然変異部位がマラリアDHFRにもたらした酵素活性の変化を調べるために精製した薬剤耐性型マラリアDHFRを用いてミカエリス定数:K_m、速度定数:k_{cat}、阻害定数:IC₅₀を測定した。基質であるジヒドロ葉酸に対するK_mは、シクログアニル耐性型であるDHFR Val 16 Thr 108 で 34.0 μM, またピリメサミン耐性型であるDHFR Asn 108, DHFR Ile 51 Asn 108, DHFR Arg 59 Asn 108 でそれぞれ 22.9 μM, 30.6 μM, 30.1 μMであり、感受性型DHFRの 4.3 μM と比較すると約

約6-9倍高い値であった。一方、補酵素であるNADPHに対する K_m はDHFR Val 16 Thr 108で52.0 μM , DHFR Asn 108, DHFR Ile 51 Asn 108, DHFR Arg 59 Asn 108でそれぞれ52.0 μM , 28.4 μM , 48.4 μM , 83.6 μM であり、感受性型DHFRの12.2 μM と比較すると約2-7倍であった(図2-1, 2, 3, 4, 5, 表2-2)。いずれの耐性型DHFRもジヒドロ葉酸、NADPHに対する K_m は高くなっており、薬剤感受性型DHFRに比べて両基質に対する親和性が下がっているのがわかる。

ピリメサミンに対する IC_{50} は、シクログアニル耐性型であるDHFR Val 16 Thr 108で22 nM, またピリメサミン耐性型であるDHFR Asn 108, DHFR Ile 51 Asn 108, DHFR Arg 59 Asn 108でそれぞれ13 nM, 840 nM, 925 nMであり、感受性型DHFRの3 nMと比較すると、シクログアニル耐性型で約7倍、ピリメサミン耐性型で約4-300倍であった(表2-2)。シクログアニルに対する IC_{50} は、シクログアニル耐性型であるDHFR Val 16 Thr 108で10000 nM, またピリメサミン耐性型であるDHFR Asn 108, DHFR Ile 51 Asn 108, DHFR Arg 59 Asn 108でそれぞれ97 nM, 320 nM, 180 nMであり、シクログアニル耐性型で約400倍、ピリメサミン耐性型で約4-13倍であった(表2-2)。いずれの耐性型DHFRもピリメサミン、シクログアニルに対する IC_{50} が高くなっており、阻害剤に対する親和性が下がっている。この変化にはDHFR Asn 108を除いて傾向があり、ピリメサミン耐性型DHFRはピリメサミンに、シクログアニル耐性型DHFRはシクログアニルに対する親和性が下がっており、それと比較するともう一方の薬剤に対してはそれほど下がっていない。

k_{cat} は、感受性型DHFRで73 1/sec, ピリメサミン耐性型であるDHFR Asn 108, DHFR Ile 51 Asn 108, DHFR Arg 59 Asn 108でそれぞれ92, 77, 84 1/secであり、これは殆ど感受性型、耐性型で変化は無かった(表2-2)。

薬剤耐性型マラリアDHFR全体を通し、 k_{cat} にではなく IC_{50} と K_m に点突然変異の影響が出ていることが示される。

熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害効果

薬剤耐性型原虫株と感受性型原虫株の間でマラリア原虫の増殖を抑える薬剤濃度が、どの程度異なるのかを酵素活性の測定で得た数値と比較するため、マラリア原虫の増殖阻害実験を培養系で行った。ピリメサミンに対する ID_{50} はFCR 3株、K 1株がそれぞれ0.18 nM, 400 nMで、3D 7株の0.2 nMでと比べるとそれぞれ約1倍、20,000倍であり、シクログアニルに対する ID_{50} はFCR 3株、K 1株が200 nM, 130 nMで、3D 7株の0.29 nMと比べるとそれぞれ約700倍、450倍であった(図2-6, 表2-3)。シクログアニル耐性株であるFCR 3株はシクログアニルに対する耐性を上昇させているが、ピリメサミンに対する耐性は向上していない。一方ピリメサミン耐性株であるK 1株はピリメサミンに対する耐性を著しく上昇させており、かつシクログアニルに対する耐性も上昇させている。

以上の結果は酵素活性の測定で得た実験結果と相関関係を示すものである。

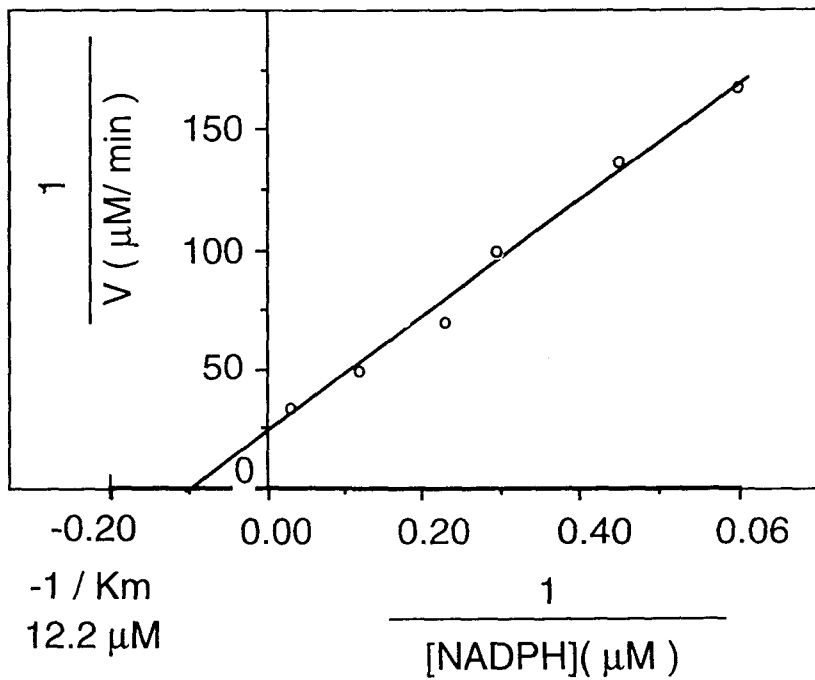
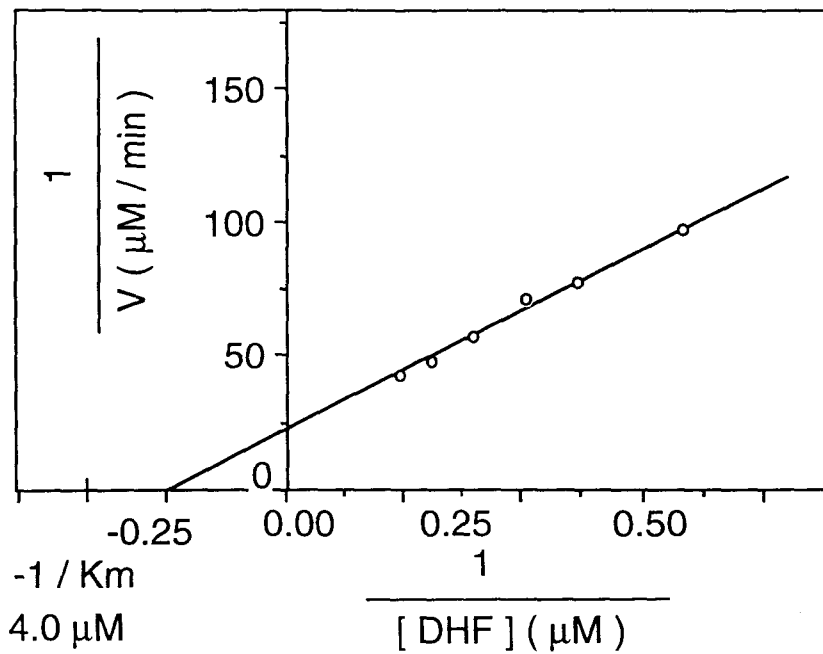


図 2-1 マラリアDHFR Ser 108 (231) のミカエリス定数
 マラリアマラリアDHFR Ser 108 (231) のミカエリス定数を測定した。反応液の体積は $200 \mu\text{l}$: 50mM Tris HCl 70mM β -SH, 1mM EDTA, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ BSA, $100\text{-}15 \mu\text{M}$ NADPH, $100\text{-}15 \mu\text{M}$ DHF, マラリアDHFR ; 37°C で2分間保温した後、DHFを加えることによって反応が開始される。反応は 340nm の吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

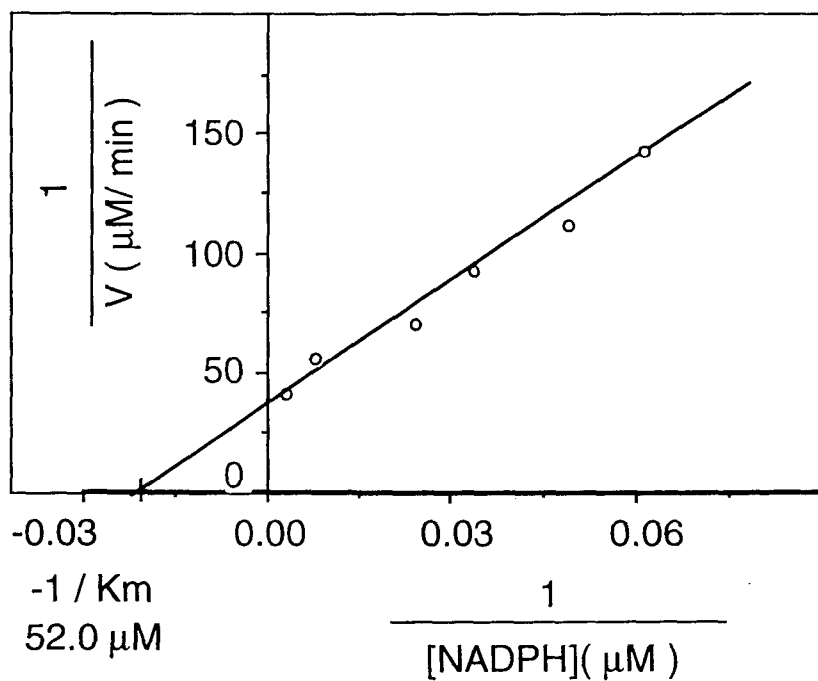
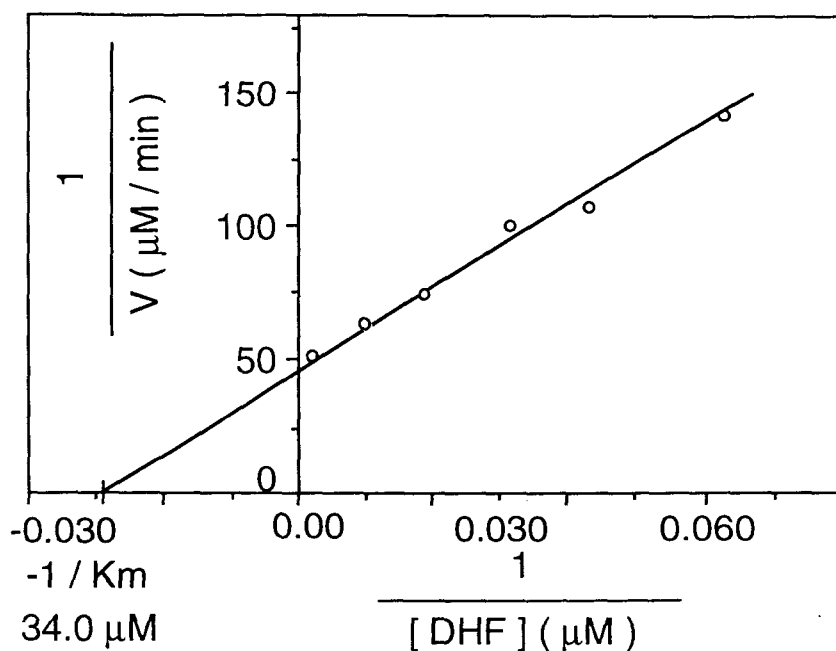


図 2-2 マラリアDHFR V16 T108のミカエリス定数
 マラリアマラリアDHFR V16 T108のミカエリス定数を測定した。反応液の体積は $200\mu\text{l}$: 50mM Tris HCl 70mM β -SH, 1mM EDTA, $100\mu\text{g/ml}$ BSA, 300 - $15\mu\text{M}$ NADPH, 300 - $15\mu\text{M}$ DHF, マラリアDHFR ; 37 度で 2 分間保温した後、DHFを加えることによって反応が開始される。反応は 340nm の吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

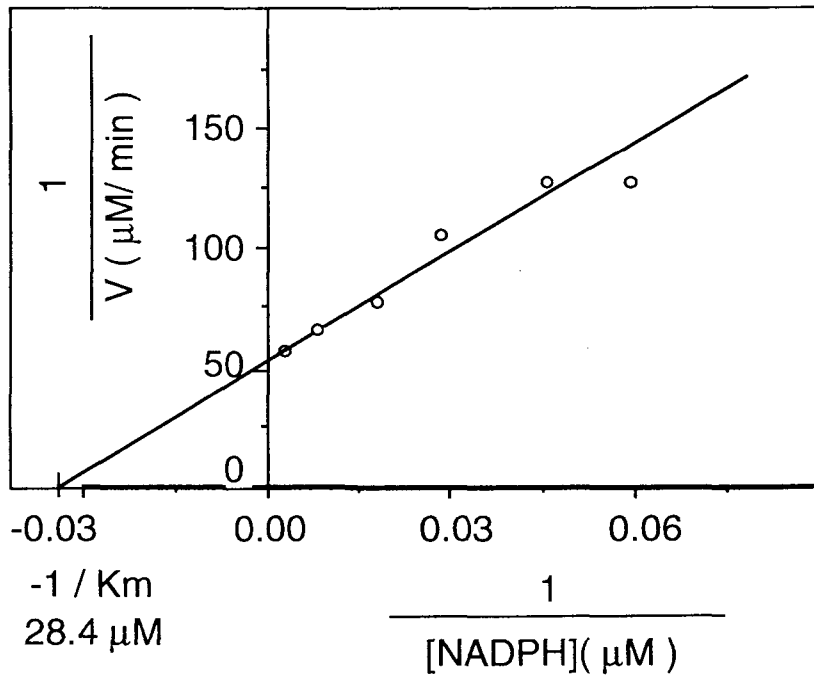
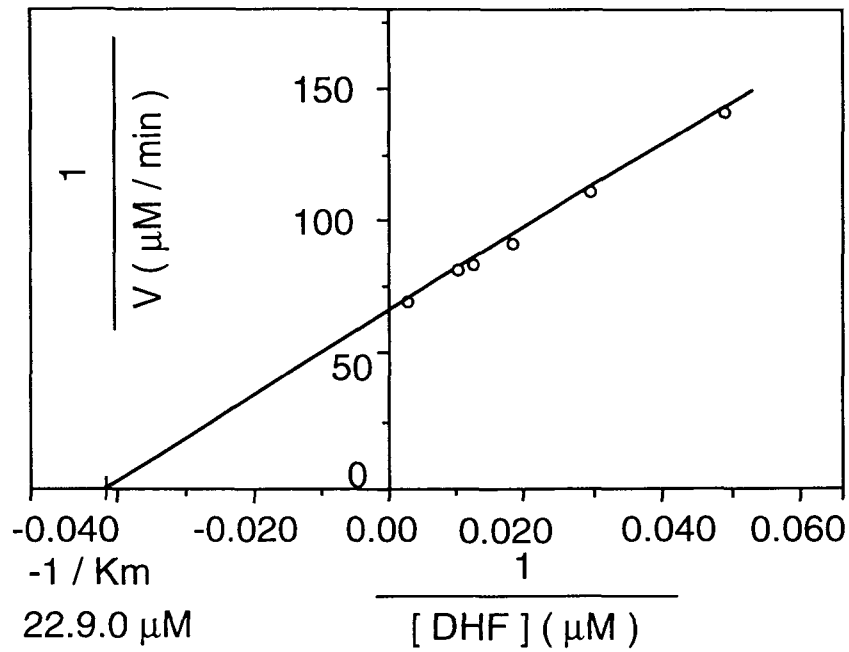


図 2-3 マラリアDHFR A108のミカエリス定数

マラリアマラリアDHFR A108のミカエリス定数を測定した。反応液の体積は $200\mu\text{l}$: 50mM Tris HCl 70mM β -SH, 1mM EDTA, $100\mu\text{g/ml}$ BSA, $300\text{-}15\mu\text{M}$ NADPH, $300\text{-}15\mu\text{M}$ DHF, マラリアDHFR ; 37 度で 2 分間保温した後、DHFを加えることによって反応が開始される。反応は 340nm の吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

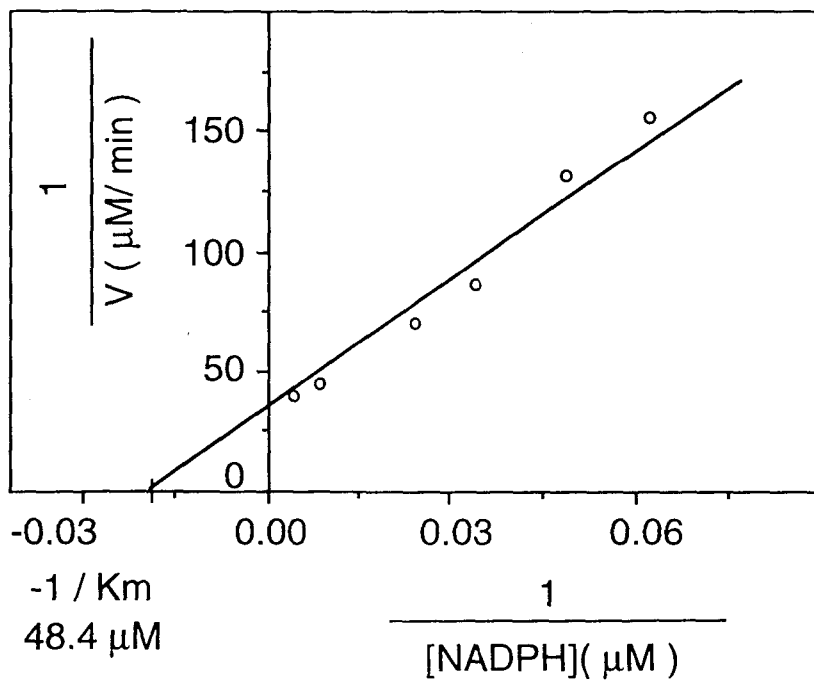
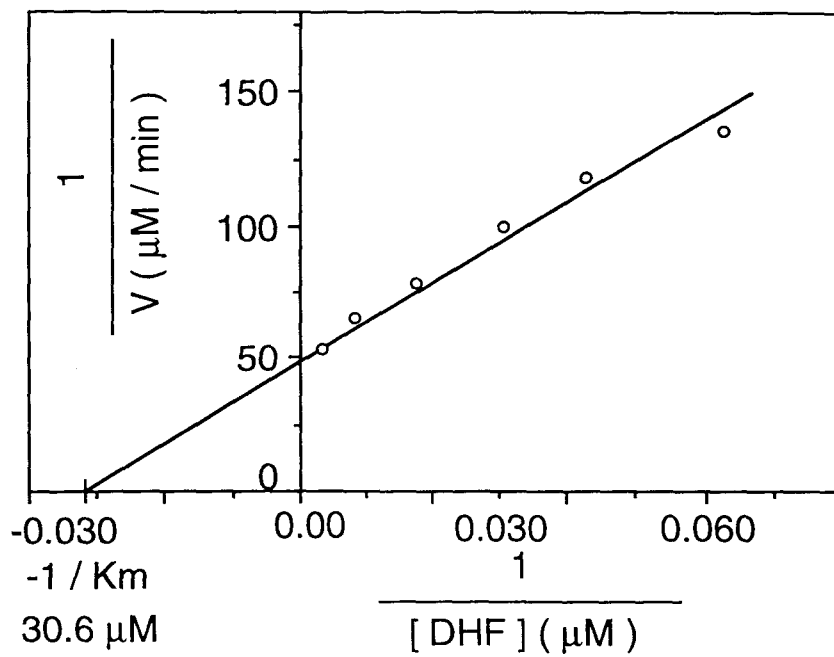


図 2-4 マラリアDHFR I51 A108 のミカエリス定数
 マラリアマラリアDHFR I51 A108 のミカエリス定数を測定した。反応液の体積は $200\mu\text{l}$: 50mM Tris HCl 70mM β -SH, 1mM EDTA, $100\mu\text{g/ml}$ BSA, 300 - $15\mu\text{M}$ NADPH, 300 - $15\mu\text{M}$ DHF, マラリアDHFR ;. 37 度で 2 分間保温した後、DHFを加えることによって反応が開始される。反応は 340nm の吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

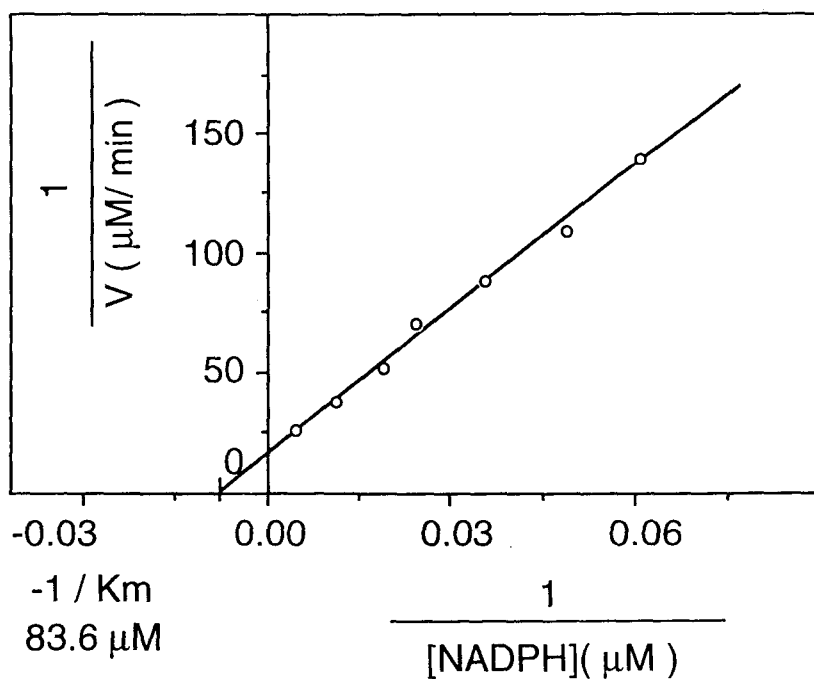
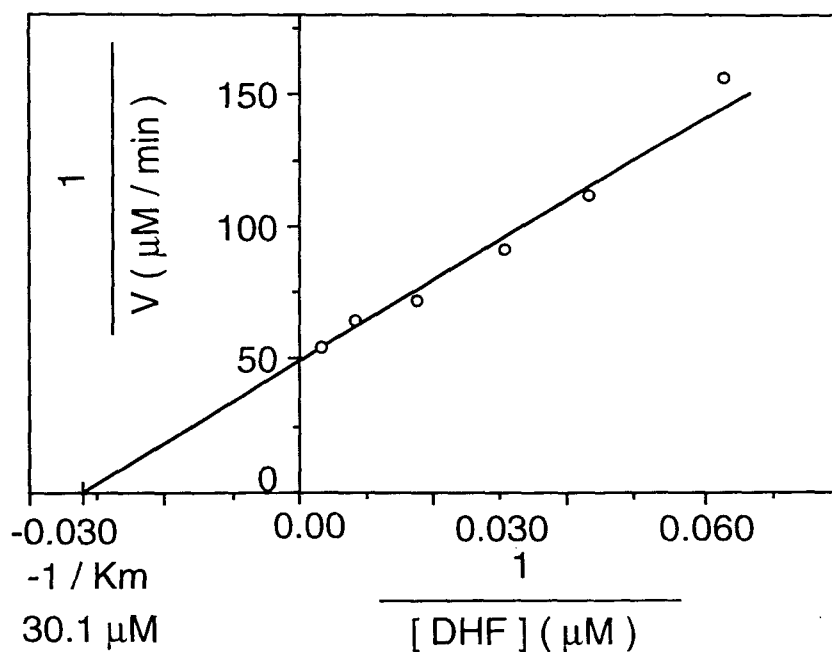


図 2-5 マラリアDHFR R59 A108 のミカエリス定数

マラリアマラリアDHFR R59 A108 のミカエリス定数を測定した。反応液の体積は $200 \mu\text{l}$: 50mM Tris HCl 70mM β -SH, 1mM EDTA, $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ BSA, 300 - $15 \mu\text{M}$ NADPH, 300 - $15 \mu\text{M}$ DHF, マラリアDHFR ; 37 度で 2 分間保温した後、DHFを加えることによって反応が開始される。反応は 340nm の吸光を日立U-2000分光光度計を用いて測定した。

Recombinant DHFR	Km (μM)		IC50 (nM)		kcat (1 / sec)
	DHF	NADPH	Pyr	Cyc	
Sensitive (Ser 108)	4.3	12.2	3	25	73
Val 16 Thr 108	34.0	52.0	22	10000	--
Asn 108	22.9	28.4	13	97	92
Ile 51 Asn 108	30.6	48.4	840	320	77
Arg 59 Asn 108	30.1	83.6	925	180	84

表 2-2 薬剤耐性型マラリアDHFRの酵素活性
再構築された遺伝子を用いて調製されたレコンビナントマラリアDHFR (Ser 108)と、シクログアニル耐性型のVal 16 Thr 108、ピリメサミン耐性型のAsn 108, Ile 51 Asn 108, Arg 59 Asn 108 の6種類のマラリアDHFRについて酵素活性を測定した。反応条件は材料と方法に記した。

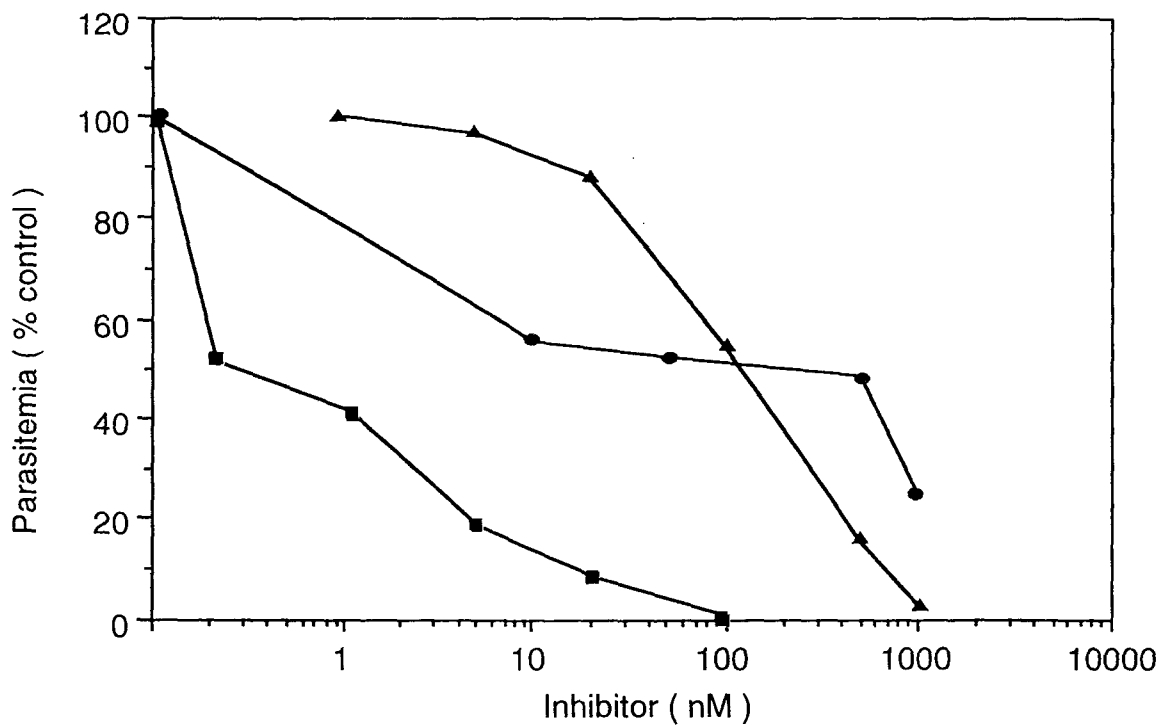
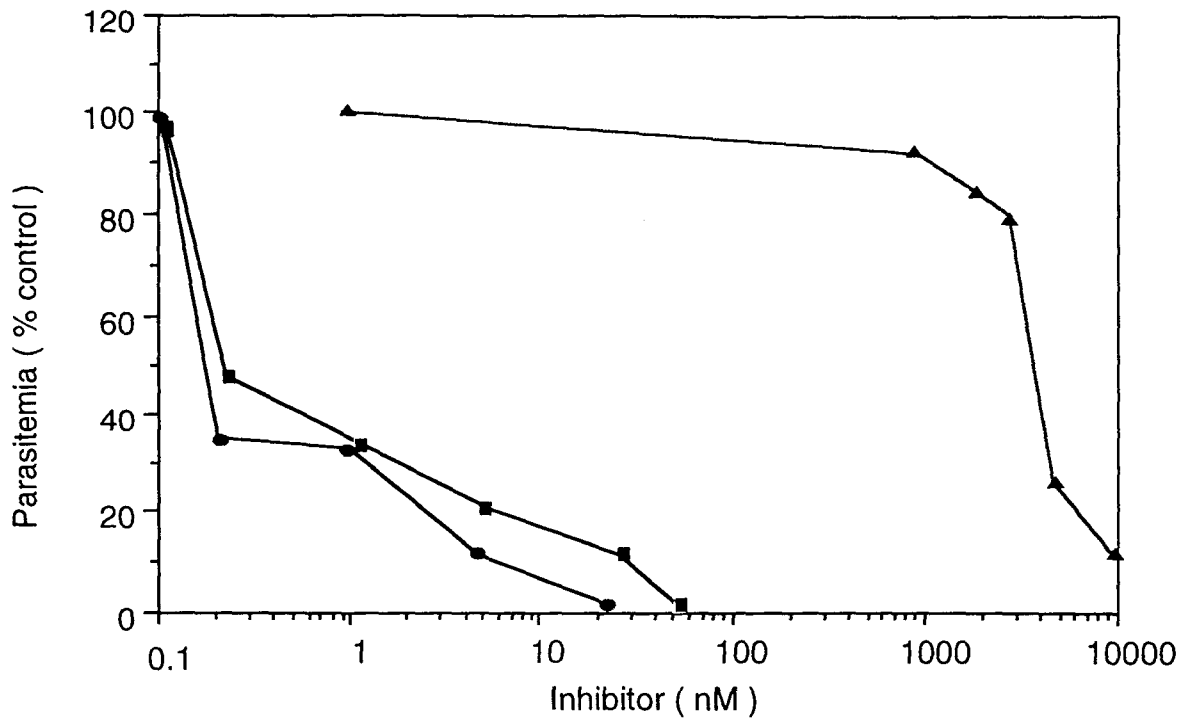


Fig 2-6 培養系におけるマラリア原虫の増殖阻害
 プリメサミンによるマラリア原虫の増殖阻害 (A) とシクログアニルによる
 マラリア原虫の増殖阻害 (B)。0.1 から10000 nMにおける薬剤濃度下で3種
 類のマラリア原虫株3D7 (■), FCR3 (●), K1 (▲), の増殖阻害効果が観
 測された。実験条件は材料と方法に記す。

Chemical compound	ID 50 (nM)			IC50 (nM)		
	3D7	FCR3	K1	Ser 108	Val16 Thr108	Arg59 Asn108
Pyrimethamine	0.2	0.18	4100	3	22	925
Cycloguanil	0.29	200	130	25	10000	180

表 2-3 プリメサミンとシクログアニルのマラリア原虫株に対する増殖阻害効果とレコンビナントDHFRに対する阻害効果

3つの原虫株 3D7, FCR3, K1 はそれぞれ Ser 108, Val 16 Asn 108, Arg 59 Asn 108 と同じアミノ酸配列を持つDHFRを持つ。実験条件は材料と方法に記す。

考察

調製した薬剤耐性型レコンビナントDHFRについて抗マラリア剤であるピリメサミンとシクログアニルがDHFRの酵素活性を半分に抑える値である阻害定数 IC₅₀ を測定した。それによると、シクログアニル耐性型のマラリアDHFR (DHFR Val 16 Thr 108) は 酵素反応系においてシクログアニルに対する親和性が薬剤感受性型DHFR (DHFR Ser 108) に比べ、低い事を示した。ピリメサミン耐性型のDHFR (DHFR Asn 108, DHFR Ile 51 Asn 108, DHFR Arg 59 Asn 108) についても同様で、ピリメサミンに対する親和性が感受性型DHFRに比べ、低い事を示した。一方上記のレコンビナントDHFRと同じアミノ酸配列のDHFRを持つマラリア原虫株を用いて培養系における増殖阻害実験を行った結果、やはりシクログアニル耐性型のマラリアDHFR (DHFR Val 16 Thr 108) を持つ原虫株 (FCR 3株) は感受性型DHFRを持つ株 (3D7株) に比べ、シクログアニルに対して耐性を示し、また同様の結果はピリメサミン耐性型のDHFR (DHFR Arg 59 Asn 108) を持つK1株についても示された。この結果は点突然変異に起因する阻害剤と標的酵素との親和性の変化が熱帯熱マラリアがDHFR阻害剤に対して獲得した耐性機構に働いていることを強く示すものである。

4種調製した薬剤耐性型DHFRのkcatは感受性型に比べてほとんど変化はなく、またジヒドロ葉酸に対するミカエリス定数 Km は感受性型の Km 値の 5-7 倍の値を示した。ジヒドロ葉酸と阻害剤がある程度似た化学構造を持つことを考慮すると、この結果はDHFR阻害剤に対する耐性度の上昇は活性中心と阻害剤との親和性の低下に起因することを支持するものである。一方、薬剤耐性型DHFRのNADPHに対するKmは感受性型のKm値の2-7倍の値を示し、ジヒドロ葉酸に対するKm値の変化とほぼ連動しており、点突然変異がNADPHに対する親和性にも影響を与えている事が示されている。ミカエリス定数 Km値は4種の薬剤耐性型DHFRと感受性型DHFRの間で最大7倍もの開きがあったが、kcatの値はほとんど同じ値を示している。これは薬剤耐性株が獲得した耐性機構の一つとして酵素レベルでは反応速度を上げて薬剤によって阻害された酵素の働きを補うのではなく、酵素と阻害剤の親和性を下げることによって耐性を得ている事を示している。

DHFRは大腸菌や乳酸菌、ニワトリやウシを材料とし、X線結晶解析やNMRなどによって立体構造と触媒機構の知見が最も蓄積された酵素の一つである。マラリアDHFRに導入した点突然変異の立体的な位置をこれまで他の生物種で蓄積された3次元構造上の情報とアミノ酸一次配列の相同性をもとに予想し、酵素の活性中心とDHFR阻害剤との親和性を変化させた機構について考察した。

大腸菌やニワトリ等より得られたDHFRの情報を基に点突然変異部位の立体的な位置を予測すると16,108位のアミノ酸残基はいずれも補酵素であるNADPHと直接接触しており、アミノ酸変異によって生じたNADPHとの親和性の変化を介して阻害剤との親和性を下げていることが予測された。薬剤耐性型マラリア原虫DHFRは必ず

108 位の位置に突然変異を起こしている。他の生物種でその位置に対応するアミノ酸は大腸菌では46位の Thr で、ニワトリでは56位の Thr であるが、それらのX線結晶解析やNMRのデータはその位置の Thr は水分子を介してNADPHのニコチンアミド基と相互作用しており、DHFR阻害剤とは位置的にかけ離れていることを示している (Filman.D.J., *et al* 1982, Matthews.D.A., *et al* 1985)。同様にマラリアDHFRの16位のアミノ酸 Ala に対応するアミノ酸は大腸菌と乳酸菌でそれぞれ7位と6位のAla であるが、大腸菌と乳酸菌ではそれらのアミノ酸もNADPHのニコチンアミドと相互作用している (Filman.D.J., *et al* 1982)。補酵素であるNADPHと相互作用するアミノ酸部位の変化が阻害剤との親和性を下げるという作業仮説はかなり受け入れ難い印象を与えるが、興味深いことにマラリアDHFRの108位のアミノ酸に対応する大腸菌の46位のアミノ酸である Thr を Ser, 又は Asn に変えた所、阻害剤に対し、マラリアDHFR同様の傾向を示したという報告がある (Diurno.M.V., *et al* 1992,)。これよりマラリアDHFRにおいても108位のアミノ酸はNADPHのニコチンアミド基と直接 van der Waals 接触する位置にあるが、そのアミノ酸変異によって阻害剤に対する親和性を下げていると考えられる。DHFR阻害剤である トリメトプリムやメトトリキセートなどはNADPHとの3元複合体の方が結合力が増す (Blackeiy.R.L., 1984)との報告もあることより108位や16位のアミノ酸変異によってNADPHの結合状態に何らかの変化が occuri、それによってDHFRと阻害剤の親和性に変化が起こったとも考えられる。

マラリアDHFRの51位や59位のアミノ酸はそれら自体は阻害剤とは直接接触する位置にはないが、アミノ酸変異によって直接接触する位置にあるアミノ酸の立体的な位置が変化し、それによって阻害剤との親和性を下げていると考察される。マラリアDHFRの51位や59位のアミノ酸に対応するのは大腸菌では23位の Asn と32位の Lys で、ニワトリでもは26位の Pro と35位の Gln であるが、それらのX線結晶解析のデータはその位置のアミノ酸は B- α helix の両端に位置しており、しかも酵素の表面に位置し、側鎖は外側を向いている (Filman.D.J., *et al* 1982, Matthews.D.A., *et al* 1985)。この2つのアミノ酸変異も直接阻害剤とは相互作用しにくい位置にあるが、同時に2つのアミノ酸は B- α helix の両端に位置している。ところでマラリアDHFRではこのB- α helix には54位に Asp がある。この54位の Asp は大腸菌DHFRでは26位の Asp、ニワトリDHFRでは30位の Glu に対応している。大腸菌とニワトリDHFRのX線解析やNMRによる解析結果より、現在ではこれらのアミノ酸が基質であるジヒドロ葉酸に水分子を介してプロトンを与えられている (Howell.E.E., *et al* 1986 Meiering.E.M., *et al* 1995)。B- α helix 上に存在し、阻害剤と直接接触する位置に存在するアミノ酸の位置的な変化が51位や59位のアミノ酸変化によって引き起こされ、酵素と阻害剤との親和性が下がったとも考えられる。

参考文献

- Banyal.H.S., and Inselberg.J., 1985 *Plasmodium falciparum*, Selection and characterization of Pyrimethamine-resistant Mutants
- BishopA. 1962 An analysis of the development of resistance to proguanil and pyrimethamine in *Plasmodium gallinaceum*. *Parasitology* **52** : 495-518
- Brobey.R.K.B., Sano.G., toh.F.I, Aso.K., Mitamura.T., andHorii. T., Novel pyrrolo(2,3-d pyrimidine antifolates screened by recombinant *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase inhibited the growth of drug resistant parasites *in vitro*. in preparation
- Blackey.R.L., 1984 Dihydrofolate reductase. In Folates and Pteridines (R.L.Blackley, S.J.Benkovic.,eds) 1 191-253, John Wiley & Sons, New York.
- Bruce-Chwatt.L.J., 1985 *Essential Malariology, 2nd Edn.* pp210- 260, William Heinemann Medical Books, London.
- Bzik.D.J., Li.W., Horii.T.,Inselberg.J., 1987 Molecular cloning and sequence analysis of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase-thymidilate syntase gene.*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.**84** 8360-8364
- Cowman.A.F.,Morry.M.J.,Biggs.B.A.,Cross.G.A.M.,Foote.S.J., 1988 Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidilate syntase gene of *Plasmodium falciparum* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.**85** 9109-9113
- Cowman.A.F., Lew.A.M., 1990 Chromosomal rearrangements and point mutations in the DHFR-TS gene of *Plasmodium chabaudi* under antifolate selection *Mol.Biochem.Parasitol*.**42** 21-30
- Dickman.A., Jung.A., 1986 The mechanism of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* *Parasitol*.**93** 275-278
- Diggens.S. M.,Gutteridge.W. E., Trigg.P. I., 1970 Altered dihydrofolate reductase associated with a pyrimethamine-resistant *Plasmodium berghei berghei* produced in a single step. *Nature* **228**: 579-580.
- Diurno.M.V.,Mazzoni.O.,Piscopo.E.,Calignano.A.,Giordano.F.,and Bolognese.A., 1992 *J.Med.Chem* **35** 2910-1912
- Ellis.R.J., Molecular Chaperones 1991 *Ann.REv.Biochem*.**60** 321-347

- Footo.S.J.,Galatis.D., and Cowman.A,F ., 1990 Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidilate syntase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. **87** 3014-3017
Proc.Natl.Sci.USA
- Garvey.E.P.,Santi.D.V., 1985 Limited proteolysis of the bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase from *Leishmania tropica*
Proc.Natl.Acad.Sci.USA.82 7188-7192
- Gabor. L., Hong. Z., and Goodman.H.M., 1993 The origin of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidilate syntase isogenes of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* vol **3** No,5 657-668
- Guo-Xian.C.,CMueller.,Wendlinger.M.,Zolg.J.W., 1987a Kinetic and Molecular properties of the dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant clones of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Mol.Pharmacol.31* 430-437
- Guo-Xian.C.,1987b Purification of bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase complex from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *Mol.Pharmacol.32* 723-730
- Hall.S.J.,Sims.P.F.G.,Hyde.J.E., 1991 Functional expression of the dihydrofolate reductase and thymidilate syntase activities of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*
Mol.Biochem.Parasitol.45 317-330
- Hillcoat.B.L.,Nixon.P.F.,and Blackley.R.L., 1967 Effect of substrate decomposition on the spectrophotometric assay of dihydroreductase.
Anal.Biochem **21** 178-180
- Horii.T., Ozawa.T.,and Ogawa.H., 1992 , Inhibitory effect of N-and C-terminaltruncated *Escherichia coli* recA gene products on functions of the wild-type rec A gene. *J.Mol.Biol*, **223**, 105-114.
- Hyde.J.E.,1989 Point mutations and pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Today* **5** 252-255
- Inselburg.J.,Bzik.D.J.,and W-B.Li., 1987 *Plasmodium falciparum*: Three amino acid chnges in the dihydrofolate reductase of a pyrimethamine resistant mutant. *Expl Parasitol.67* 361-363
- Inselburg.J.,Bzik.D.J.,and Horii.T., 1987 Pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum* overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication *Mol.Biochem.Parasitol.26* 121-134

- Inselburg.J.,Zhang.R.D., 1988 Study of dihydrofolate reductase thymidilate syntase in *Plasmodium falciparum* *Am J.Med Hyg* **39** 328-336
- J.A.Coderre,S.M.Beverley,R.T.Schimke,D.V.Santi Overproduction of a bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania tropica* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.***80** 2132-2136
- Jana.S.,McBride.C.I.,Newbold.R., 1985 Polymorphism of a high molecular weight shizont antigen of the human mararia parasite *Plasmodium falciparum* *J.Exp.Med* **161** 160-180
- Kan.S.C.,Siddiqui.W.A., 1979 Comparative studies on dihydrofolate reductase from *Plasmodium falciparum* *J.Protozool.***26** 660-664
- Knighton.D. R., Chen-Chen Kan,Howerd. E.,Janson.C.A.,Hostomska.Z., Welsh.K.M., and Mattews.D.A., 1994 Structure of and kinetic channeling in bifunctional dihydrofolate reductase-thymidilate syntase. *Nature structural biology* **3** 186-194
- Kumar.S.,Miller.L.H.,Quakyi.I.A.,Keiser.D.B.,Houghten.R.,Maloy.W.L.,Mos s.B.,Berzofsky.J.A.,Good.M.F., 1988 Cytotoxic T cells Specific for the Circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* *Nature* **334** 258-260
- Lockyer.M.J.,Marsh.K.,Newbold.C.I., 1989 Wild isolates of *Plasmodium falciparum* show extensive polymorphism in T cell epitopes of the circumsporozoite protein *Mol.Biochem.Parasitol.***37** 275-280
- McCutchan.T.,Welsh.J.A.,Dame.J.B.,Quakyi.I.A.,Graves.P.M.,Drake.J.C.,Al legra.C.J., 1984 Mechanism of Pyrimethamine resistance in recent isolates of *Plasmodium falciparum* *Antimicro.Agent.Chemotherapy***26**.656-659
- Meek.T.D.,Gervey.E.D.,Santi.D.V., 1985 Pulification and characterization of the bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase from Methotrexate-resistant *Leishmania tropica* *Biochemistry* **24** 678-686
- Messing.J., 1983 New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**,20-78
- Nakamae.K.L., Eckstein.F., 1986. Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorotiate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucl.Acids Res.*,**14**,9679-9698.
- Papadopoulou.B., Roy.G., Ouellette.M., 1992 A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania* *EMBO* **11** 3601-3608

- Pattanakitsakul.S.,Ruenwongsa.P., 1984 Characterization of thymidilate syntase and dihydrofolate reductase from *Plasmodium berghei* *Int.J.Parasitol* **14** 513-520
- Peterson.D.S.,Milhous.W.K.,Wellems.T.E., 1990 Molecular basis of differential resistance to cycroguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.***87** 3018-3022
- Peterson.D.S.,Walliker.D.,Wellems.T.E., 1988 Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidilate syntase confers resistance to pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.***85** 9114-9118
- Reche P; Arrebola R; Olmo A; Santi DV; Gonzalez-Pacanowska D; Ruiz-Perez LM 1994 Cloning and expression of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Trypanosoma cruzi*.*Mol Biochem Parasitol* **65**: 247-58
- Richardson.J., 1981 *Adv.Prot.Chem.* **34**: 174-175
- Sanger.F., Nicklen.S., and Coulson.A.R., 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **74** 5463-5467
- Sirawaraporn.W.,Yuthavong., 1984 Kinetic and Molecular properties of dihydrofolate reductase from pyrimethamine sensitive and pyrimethamine resistant *Plasmodium chabaudi* *Mol.Biochem.Parasitol.***10** 355-367
- Sirawaraporn.W.,Sirawaraporn.R.,Cowman.A.F.,Yuthavong.Y.,Santy., 1990 Heterologous expression of active thymidilate syntase-dihydrofolate reductase from *Plasmodium falciparum* *Biochemistry.***29** 10779-10789
- Sirawaraporn.W.,Yuthavong., 1986 Potentiating effect of pyrimethamine and sulfadoxine against dihydrofolate reductase from pyrimethamine sensitive and pyrimethamine resistant *Plasmodium chabaudi* *Antimicrob.Agents Chemother.***29** 899-905
- Snewin.V.A.,Susan. M., England.F.G., and Hyde.J.E., 1989 Characterisation of the dihydrofolate reductase-thymidilate syntase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine. *Gene* **76** 41-52
- Studier.F.W. , Rosenberg.A.H., Dunn.J.J., and Dubendorff.J.W., 1990 Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* **185** 60-89

- Tanabe.K.,Mackay.M.,Goman.M.,Scaife.J.G., 1987 Allelic Dimorphism in a Surface Antigen Gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* *J.Mol.Biol* **195** 273-287
- Tanaka.M.,Hao-Ming.Gu.,Bzik.D.J.,Wu-Bo.L.,Inselberg.J.W., 1990 Dihydrofolate reductase mutants and chromosomal changes associated with pyrimethamine resistance of *Plasmodium falciparum* *Mol.Biochem.Parasitol.***39** 127-134
- Tanaka.M.,Hao-Ming.Gu.,Bzik.D.J.,Wu-Bo.L.,Inselberg.J.W., 1990 Mutant dihydrofolate reductase genes in pyrimethamine resistant *Plasmodium falciparum* with polymorphic chromosome disruptions *Mol.Biochem.Parasitol.***42** 83-92
- Thaithong.S.,Chan.S.,Songsomboon.S.,Wilairat.P.,Seesod.N.,Sueblinwong.T.,Goman.M.,Ridley.R.,Beale.G., 1992 Pyrimethamine resistant mutations in *Plasmodium falciparum* *Mol.Biochem.Parasitol.***52** 149-158
- Wada.K.,Aota.S.,Tsuchiya.R.,Ishibasi.F.,Gojobori.T.,Ikemura.T., 1990 Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data *Nucl.Acids Res*,**18** 2367-2411
- Walter.R.D., 1986 Altered dihydrofolate reductase in pyrimethamine-resistant *Plasmodium falciparum* *Mol.Biochem.Parasitol.***19** 61-66
- Walliker.D., CarterR., and Sandersom.A., 1975 Genetic studies on *Plasmodium chabaudi*: recombination between enzyme markers. *Parasitology* **70**: 19-24
- Walliker.D., Sandersom.A., Yoeli.M., and Hargreaves.B.J., 1976 A genetic inversion in a rodent malaria parasite. *Parasitology* **72**: 183-194
- Washtien.W.L,Gruumont.R,Santi.D.V., 1985 DNA amplification in antifolate-resistant *Leishmania* *J.Biol.Chem.***260** 7809-7812
- Zolg.J.W.,Chen.G.X.,Plitt.J.R., 1990 Detection of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* by mutation-specific polymerase chain reaction *Mol.Biochem.Parasitol.***257-266**
- Zolg.J,W., Plitt. J,R.,Chen.G,X., Palmer S 1989 Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Methods in Enzymology***36**: 253-62

第三章

Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体のスクリーニング

要旨

マラリア原虫DHFRを選択的に阻害する化合物を得るため、ウシDHFRを対象酵素とし、大腸菌を使って大量に調製された薬剤感受性マラリアDHFRと薬剤耐性型マラリアDHFRを用いて、基質であるジヒドロ葉酸に近い化学構造を持つ約120種のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine誘導体をスクリーニングした。その結果、現在マラリア治療に使用されているシクログアニルと同程度の選択性でマラリアDHFRを阻害する4種の化合物を選び出すことができた。これらの化合物をシクログアニル耐性型のFCR3株とピリメサミン耐性型のK1株、薬剤感受性型の3D7株の計3種類の熱帯熱マラリア原虫の培養系に加えたところ、実際にマラリア原虫の生育を阻害し、しかもその阻害効果は各々の化合物が*iv vitro*の系で薬剤耐性型、感受性型のレコンビナントDHFRに対して示した阻害効果を反映したものであった。

以上の結果は大量発現されたレコンビナントDHFRを用いた化合物のスクリーニング系がマラリア原虫を用いた系と同様に使えること、また薬剤耐性型DHFRを用いることによって現在世界中に蔓延している薬剤耐性型マラリア原虫に対しても有効に作用する化合物をスクリーニングできる系が構築され、実際に新たな抗マラリア剤が得られることを示すものである。

序論

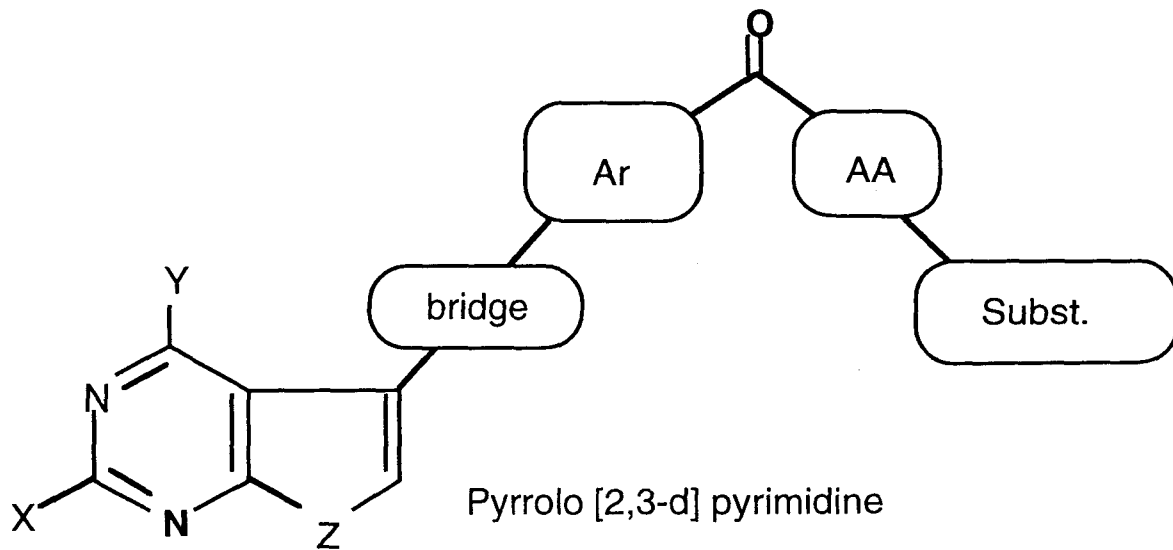
クロロキン、DDTなどの特効薬や殺虫剤により一時は撲滅が可能かと思われたマラリアは、薬剤耐性のマラリア原虫株や、殺虫剤耐性の媒介蚊の出現によりその治療と制圧が非常に困難な状況に陥っている。これまで多くの抗マラリア剤が治療及び予防に広く使用されてきたが、現在ではそれらの薬剤に対する耐性株がほとんどの感染地帯に拡散してゆき、薬剤の使用頻度の高い都市部では多剤耐性株の出現も報告されており、新しい抗マラリア剤の開発が急務の課題となっている。

薬剤耐性株に対する有効な解決法の一つに新規に開発された複数の薬剤を併用するという方法がある。一種類の薬剤に対する耐性株の発生する頻度を仮に百万分の1とすると2種3種の薬剤を併用すればそれらの薬剤に対し耐性を持つ耐性株の出現は事実上無くなる。これは実際にマラリア原虫に対しても応用されており、マラリア原虫のDHFRを標的としたピリメサミンと、同じくマラリア原虫のDHPR（ジヒドロプテロイン酸還元酵素）とDHFS（ジヒドロ葉酸合成酵素）を標的にすると考えられるサルファ剤の合剤、ファンシダールはピリメサミン耐性株の蔓延する現在においても主要な薬剤の一つである。しかしピリメサミンの耐性株が蔓延した後には使用が開始されたためファンシダール耐性マラリア原虫が最近報告されている（WHO, 1988）。ピリメサミン、シクログアニルの耐性株は酵素と阻害剤との親和性を低下させ、耐性を得ていることが第二章で示された。そのためピリメサミン、シクログアニルとは異なった化学構造を持つ化合物は現在世界各地で蔓延している耐性株に対しても有効に作用することが期待される。

pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体（Mita.T., et al 1991, Itoh.F., et al 1994, Aso.K., et al 1995, Itoh.F., et al 1995, 図 3-1）は元々ヒトのDHFRを阻害する抗癌剤の候補化合物として合成された物である。そのためヒトDHFRを阻害する抗癌剤であるメトトリキセートに化学構造が似ている（図 3-2）。薬剤耐性の熱帯熱マラリア原虫はピリメサミンとシクログアニルに対する耐性を獲得したが、pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体はそれとは化学構造がかなり異なる（図 -2, 図 3-2）ために、薬剤耐性の熱帯熱マラリア原虫の増殖も有効に阻害できる可能性がある。

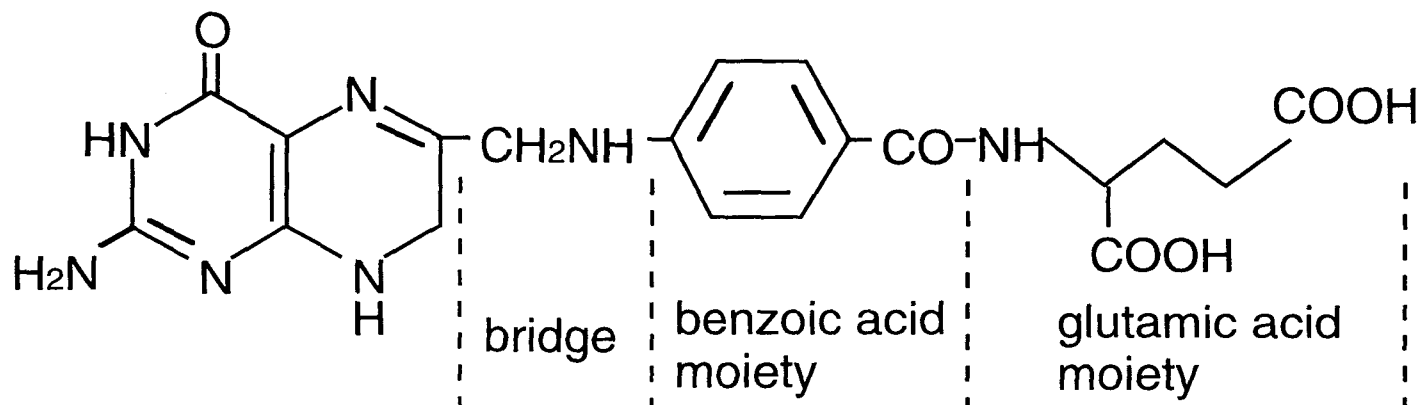
抗マラリア剤の開発の上でこれまで大きな障害となってきたのが、薬剤となりうる候補化合物のスクリーニングに要求される莫大な経済的、時間的な負担である。何百何千もの化合物を試験する一次スクリーニングにはマラリア原虫の培養系が用いられる。ところがその実験系は人間の血液を大量に必要とし、また多数の熟練した技術を持つ研究者を必要とする。第一章、第二章で構築されたレコンビナントDHFRの*in vitro*の実験系は培養マラリア原虫を用いたスクリーニング系に比べ、経済的、時間的な面ではるかに優れており、このスクリーニング系を用いてこれまで不可能だった何百種類の薬剤をスクリーニングすることを可能にした。

そこで本章では約120種類のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体のマラリアDHFRとウシDHFRに対する阻害定数IC₅₀を測定し、選択性が25倍以上の化合物4

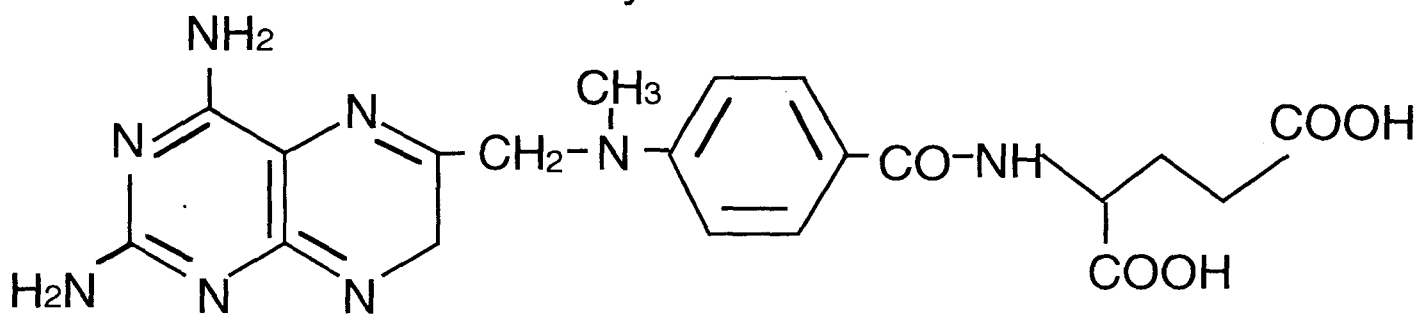


X	Y	Z	bridge	Ar	AA	Subst.
NH ₂	NH ₂	NH	CH ₂ NH	Ph	Glu	-
H	OH	NH H ₂	CH ₂	Ph-3,4,5-(OMe) ₃	Orn	NH-Tet
		S	(CH ₂) ₂	Thiophene	Ser	COPh-4-COOH
		O	(CH ₂) ₃		-	N(CH ₂ COOH)Ph-4-COOH
		NMeCH ₂ C(Me) ₂ -			etc.	etc.
		etc.				

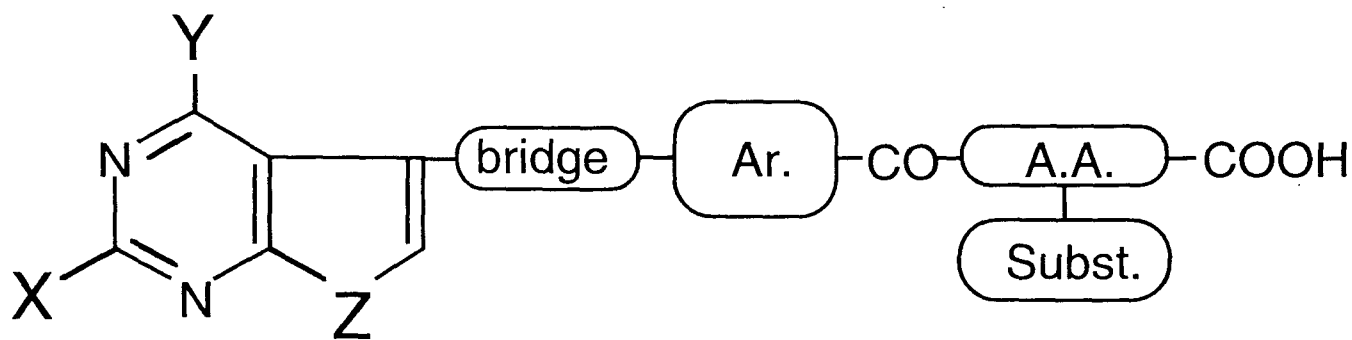
図 3-1 pyrrolo[2,3-d] purimidine 誘導体の化学構造式
 X, Y, Z, bridge, Ar (Aromatic ring), AA (amino acid), Subst,
 の部分に記された修飾基が付加されている。



Dihydrofolic acid



Methotrexate



Pyrrolo [2,3-d] pyrimidine

図 3-2 Dihydrofolic acid, Methotrexate,
Pyrrolo [2,3-d] pyrimidine の化学構造式

種を選び出した。またそれらについて、第二章で構築した薬剤耐性型マラリアDHFRに対する阻害定数 IC₅₀を測定した。その一方で選び出した化合物の培養液中の薬剤感受性型、耐性型の熱帯熱マラリア原虫に及ぼす増殖阻害効果を調べた。

材料と方法

菌株と培地

第二章と同様、蛋白の発現にはBL21(DE-3) Lys-S (Studier.F.W., *et al* 1990) を、プラスミドは pET-3a (Studier.F.W., *et al* 1990) を使用し、大腸菌の培養には L-broth を使用した。

レコンビナントマラリアDHFRの誘発と精製

薬剤耐性型マラリアDHFRの誘発と精製は第二章と同様の方法で行った。

Pyrrolo[2,3-d] pyrimidine 誘導体

Pyrrolo[2,3-d] pyrimidine 誘導体 (Mita.T., *et al* 1991, Itoh.F., *et al* 1994, Aso.K., *et al* 1995, Itoh.F., *et al* 1995, 図 3-1, 表 3-1) は武田薬品工業より供与された。Pyrrolo[2,3-d] pyrimidine 誘導体は純水か 0.1 M の NaOH に 2 mM の濃度で調製された。Pyrrolo[2,3-d] pyrimidine 誘導体はこの条件で安定に保たれることが確認されている(Aso.K., *personal communication*)。

化合物のレコンビナントDHFRに対する阻害効果の測定

Pyrrolo[2,3-d] pyrimidine 誘導体のマラリアDHFR, ウシDHFRに対する阻害効果の測定は第一章、第二章と同様の方法で行った。反応系のPyrrolo[2,3-d] pyrimidine 誘導体濃度を 0-2000 nM の範囲で変化させ、各濃度下での反応速度を算出し、DHFR阻害剤の濃度とともに semi-logarism プロットにあてはめ、反応速度が半分になる阻害剤濃度を IC 50 とした。

マラリア原虫の培養と増殖阻害実験

Pyrrolo[2,3-d] pyrimidine 誘導体の培養系におけるマラリア原虫に対する増殖阻害実験は、第二章と同様の方法で行った。

Chemicals	X	Y	Z	bridge	Ar	AA	Subst.
63505	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	N(CH2COOH)Ph-4-COOH
67508	NH2	NH2	NH	CH2C(Me)2-	Ph	Glu	NH-Tet
60868	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COPh-4-COOH
67385	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NH-2-Napht-5-COOH
67195	NH2	NH2	NH	CH2CH(Me)-	Ph	Glu	NH-Tet
67509	NH2	NH2	NH	CH2CH(Et)-	Ph	Glu	NH-2-Thiazol-4-CH2COOH
62111	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	CO-3-Py-6-COOH
61924	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-4-COOH
64127	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	N(CH2COOH)Ph-3-COOH
66396	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	NorVal	NHPh-3-COOH
66541	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-6-F-3-COOH
67384	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NH-2-Napht-4-COOH
58059	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COPh-2-COOH
62113	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COPh-3,4-OCH2O-
62757	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-3-COOH
64150	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	SO2Ph-3,5-(COOH)2
66172	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NH-3-Py-5-COOH
60146	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Lys	COPh-2-COOH
60624	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	CO-2-Napht-3-COOH
62112	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COPh-4-NHAc
61923	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-3-OH
63506	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu-(d)-Tet	
60869	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COCH=CHCOOH
63504	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-3-Tet
63507	NH2	NH2	NH	(CH2)3	Ph	Glu-(d)-Tet	
64126	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	DAB	CONHPh-3-COOH
62114	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COCH2CH2COOH
64125	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-2-Tet
64905	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NH-Tet
62135	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-2-COOH
64621	NH2	NH2	NH	CH2NH	Ph	Glu	
66170	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NH-2-Thiazol-4-CH2COOH
65518	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NH-2-Py-COOH
62115	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COPh-2,6-Me2

表 3-1 (1) Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の修飾基

Chemicals	X	Y	Z	bridge	Ar	AA	Subst.
66731	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	NorVal	Glu
63503	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-4-Tet
60145	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	DAB	COPh-2-COOH
62110	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COPh-2-OH
64776	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NH-3-CH2COOH
59231							PT523
66768	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NH-5-Bz-triazole
60994	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	t-Leu
63501	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-2-OH
64149	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	SO2Ph-2-COOH
60147	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COPh-2-CONcBu
62761	NH2	NH2	NH	(CH2)3	Ph	Orn	CO-2-Narht-3-COOH
64775	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	DAB	CONHPh-3-B(OH)2
64987	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	NH2-Adip	
66414	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-3-COOH-4-OH
64146	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	CONHPh-4-F
60148	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-3-B(OH)2
64904	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Ser	CH2Ph-4-COOH
60568	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	CO-1-Napht
65519	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	DAP	CONHPh-3-COOH
66282	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-3-COglu
61922	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	Phe
62109	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Orn	COPh-3,4,5-(OMe)3
67194	NH2	NH2	NH	CH2NH	Ph	Glu	NH-Tet
60995	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	Gly
62758	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-4-CN
62759	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-4-OH
64774	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	NHPh-2-CN
63986	NH2	NH2	NH	CH2	Ph	Glu	
64079	NH2	NH2	NH H2	(CH2)2	Ph	Glu	
47660	NH2	NH2	NH	(CH2)2	Ph	Glu	
55156	NH2	NH2	S	(CH2)2	Ph	Glu	
55477	NH2	NH2	O	(CH2)2	Ph	Glu	
44973	NH2	NH2	NH	(CH2)3	Ph	Glu	

表 3-1 (2) Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の修飾基

Chemicals	X	Y	Z	bridge	Ar	AA	Subst.
44603	NH2	NH2	NH	(CH2)2NMe	Ph	Glu	
44604	NH2	NH2	NH H2	(CH2)2NMe	Ph	Glu	
39411	NH2	OH	NH 6-bridge	CH2NH	Ph	Glu	
39412	NH2	OH	NH 6-bridge	CH2N(Me)-	Ph	Glu	
41440	NH2	OH	NH	(CH2)2	Ph	Glu	
42488	NH2	OH	NH	(CH2)3	Ph	Glu	
42759	NH2	OH	NH	(CH2)3	Ph-3,4,5-(OMe)3		
43406	NH2	OH	NH	(CH2)2-CH(OH)-	Ph-3,4,5-(OMe)3		
43407	NH2	OH	NH	(CH2)2-CH(OH)-	Ph-3,4,5-(OMe)3		
43704	NH2	OH	NH	(CH2)2	Ph-3,4,5-(OMe)3		
44158	NH2	NH2	NH 6=O	(CH2)3	Ph-3,4,5-(OMe)3		
44160	NH2	NH2	NH H2	(CH2)3	Ph-3,4,5-(OMe)3		
44419	H	NH2	NH 6=O	(CH2)3	Ph-3,4,5-(OMe)3		
47274	NH2	OH	NH	CH2NHCH2	Ph	Glu	
47275	NH2	SH	NH	CH2NHCH2	Ph	Glu	
47761	NH2	NH2	NH H2 6-bridge	(CH2)3	Ph	Glu	
49075	NH2	NH2	NH	(CH2)3	Ph	D-Glu	
49172	NH2	NH2	NH H2	(CH2)2-O-	Ph	Glu	
49174	H	NH2	NH	(CH2)3	Thiophene	Glu	
49372	NH2	NH2	NH H2	(CH2)2-S-	Ph	Glu	
52058			DMPDDF				
54092	Me	NH2	NH	(CH2)3	Ph	Glu	
54316	H	NH2	NH	(CH2)3	Ph	Glu	

表 3-1 (3) Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の修飾基

結果

pyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体のスクリーニング

マラリアDHFRの酵素活性を強く阻害し、ヒトDHFRはあまり阻害しないような阻害剤を選び出すための1次スクリーニングとして約120種類のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の阻害活性IC₅₀を薬剤感受性型のマラリアDHFRについて全部調べた。次にpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体を34個選び、それらのウシDHFRに対するIC₅₀を調べた(表3-2)。これはウシDHFRはヒトDHFRと非常に良く似た三次元構造を持つため(Kaufman.B.T., *et al* 1980, Oefner.B.T., *et al* 1988)ウシDHFRによってヒトDHFRに対する副作用をある程度予測できると考えたためである。また比較のため、ピリメサミンとシクログアニルに対するIC₅₀も両酵素について測定した。マラリアDHFRとウシDHFRのIC₅₀の比はその阻害剤の選択性を示す。その結果34種の誘導体の選択性は3倍から70倍の幅で検出された。一方ピリメサミンとシクログアニルに対する選択性はそれぞれ433倍と76倍であった。以降の実験に用いたpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体は25倍から70倍の選択性を示したT-441602, T-49372, T-49372, T-64905の4種である。

薬剤耐性型マラリアDHFRに対するpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の阻害効果

マラリアDHFRとウシDHFRでスクリーニングされた化合物が薬剤対型のマラリアDHFRをどの程度阻害するのかを測定するために選択性の高い4種類の阻害剤T-441602, T-49372, T-49372, T-64905とピリメサミン、シクログアニルについてシクログアニル耐性型のDHFR Val16 Thr108 とピリメサミン耐性型のDHFR Asn 108 と DHFR Arg 59 Asn 108 について阻害定数IC₅₀を測定した(表3-2,3)。第2章に示したようにシクログアニル耐性型のDHFR Val16 Thr108 は薬剤感受性型のDHFR Ser 108 に比べシクログアニルに対する阻害効果が1/400に低下している。これはピリメサミン耐性型のDHFRについても同様でやはり阻害効果は1/5, 1/308に低下している。ところが5種類のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の内、T-44160 はDHFR Asn 108を除いて薬剤耐性型のマラリアDHFRを感受性型DHFRと同じ強さで阻害している。また、T-49172, T-64905も薬剤耐性型のマラリアDHFRを感受性型に比べて1/10程度に阻害している。これは各薬剤の耐性型DHFRが感受性型に比べ、それぞれ耐性を示す薬剤については1/400 - 1/308しか阻害されない事に比べると4種類のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体は耐性型DHFRをよく阻害している。ピリメサミンやシクログアニルと全く異なった化学構造を持つpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体をスクリーニングすることによって薬剤耐性型マラリアDHFRを感受性型DHFRと同程度で阻害する化合物を選び出せた。

Chemicals	IC50 S108	IC50 V16T108	IC50 N108	IC50 R59N108	IC50 bovine	selectivity bovine / S108
Pyrimethamine	3.0	22.0	15.0	924.0	1300.0	433.3
Cycloguanil	25.0	10000.0	85.0	180.0	1900.0	76.0
Methotrexate	1.8	8.8	36.0	4.9	5.8	3.2
63505	1.5		14.0		6.0	4.0
67508	0.8	9.5	8.2	50.0	10.0	12.5
60868	1.8		9.2			
67385	2.7		5.6			
67195	1.8	11.4	2.8	86.0	13.0	7.2
67509	1.8	10.2	7.4	46.0	9.0	5.0
62111	6.2		13.5			
61924	2.5		15.5			
64127	3.4		12.0			
66396	3.8					
66541	2.5		5.8			
67384	2.6		11.0		22.0	8.5
58059	3.3					
62113	20.0					
62757	1.5					
64150	1.3		3.5		11.0	8.5
66172	3.0		9.0			
60146	3.8		17.0		15.0	3.9
60624	10.0		14.0			
62112	28.0		56.0			
61923	9.5					
63506	2.4	10.6	6.0	14.0	18.0	7.5
60869	4.1					
63504	3.6		15.0			0.0
63507	18.0	40.0	98.0	290.0	150.0	8.3
64126	2.7		16.5		12.0	4.4
62114	3.4		15.5		31.0	9.1
64125	2.2		3.9		18.0	8.2
64905	1.1	12.0	9.0	22.0	25.0	22.7
62135	1.7		6.6			
64621	62.0	100.0	280.0	145.0	180.0	2.9
66170	2.8		15.5			
65518	22.0		105.0		240.0	10.9
62115	10.5					
66731	2.2		10.5		28.0	12.7
63503	5.6					
60145	5.0					

表3-2 (1) IC 50 of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine

Chemicals	IC50 S108	IC50 V16T108	IC50 N108	IC50 R59N108	IC50 bovine	selectivity bovine / S108
62110	3.6					
64776	1.6		5.4		13.0	8.1
59231	2.0		8.8		14.0	7.0
66768	2.9					
60994	1.5	8.1	9.6	12.0	22.0	14.7
63501	2.7					
64149	3.0					
60147	6.6					
62761	28.0				30.0	1.1
64775	5.4					
64987	5.3					
66414	2.3					
64146	14.5					
60148	6.2					
64904	3.5					
60568	11.0					
65519	2.1		6.0		22.0	10.5
66282	4.2					
61922	1.9	11.0	7.4	18.0	28.0	14.7
62109	9.0					
67194	20.0	56.0	36.0	27.0	32.0	1.6
60995	10.5					
62758	12.5					
62759	3.6		15.0		24.0	6.7
64774	4.9					
63986	500.0					
64079	380.0	500.0	1400.0	2200.0	400.0	1.1
47660	13.5	22.0	36.0	20.0	86.0	6.4
55156	4.0	18.0	16.0	29.0	68.0	17.0
55477	220.0	500.0	1400.0	1450.0	10500.0	47.7
44973	135.0	190.0	500.0	2600.0	440.0	3.3
44603	105.0	180.0	250.0	1300.0	320.0	3.0
44604	13.0	32.0	40.0	220.0	190.0	14.6
39411	>50000					
39412	>50000					
41440	>50000					
42488	>50000					
42759	>50000	>50000				
43406	>50000					
43407	>50000					

表 3-2 (2) IC 50 of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine

Chemicals	IC50 S108	IC50 V16T108	IC50 N108	IC50 R59N108	IC50 bovine	selectivity bovine / S108
43704	>50000					
44158	>50000					
44160	500.0	400.0	2300.0	1800.0	22000.0	44.0
44419	>50000					
47274	>50000					
47275	>5000					
47761	380.0					
49075	1600.0					
49172	200.0	220.0	900.0	1200.0	14000.0	70.0
49174	5100.0					
49372	32.0	50.0	280.0	950.0	820.0	25.6
52058	>5000					
54092	2800.0					
54316	>5000					

表3-2 (3) IC 50 of Pyrrolo[2,3-d]pyrimidine

<i>P.f.</i> recombinant DHFR	Chemical compounds					
	T-44160	T-49172	T-49372	T-64905	Pyr	Cyc
Sensitive (W.T)	1 (500 nM)	1 (200 nM)	1 (32 nM)	1 (1.1 nM)	1 (3 nM)	1 (25 nM)
Val 16 Thr 108	0.8	1.1	1.6	11.0	7.3	400.0
Asn 108	4.6	4.5	8.8	8.2	4.3	3.8
Ile 51 Asn 108	0.84	6.8	47.0	9.5	280.0	12.8
Arg 59 Asn 108	0.66	6.0	47.0	7.3	308.0	7.2

表 3-3 purrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体とピリメサミン、シクログアニルの各種耐性型レコンビナントマラリアDHFRに対する阻害効果の比較。薬剤感受性型マラリアDHFRに対する阻害活性を1として、その比率を記した。()の中にはIC50が記してある。

熱帯熱マラリア原虫に対するpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の増殖阻害効果

in vitro の実験系でスクリーニングされたDHF R 阻害剤が実際に培養系におけるマラリア原虫の増殖を阻害するのかを調べるため、また感受性株と耐性株に対する増殖阻害効果の差を調べるため、スクリーニングされた4種類のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体と、ピリメサミン、シクログアニル を3D7株、FCR3株、K1株を培養している培地にそれぞれ濃度を変えて加え、培地中のマラリア原虫の数を薬剤を入れなかったものの半分に抑える薬剤濃度：ID50 を測定した(図3-3,4,5,表3-4)。ピリメサミン耐性株は感受性株に比べ、ピリメサミンに対するID50の比は約20000であり、又シクログアニル耐性株は感受性株に比べ、シクログアニルに対するID50の比は約700倍である。それに比べpyrrolo[2,3-d]pyrimidine 誘導体の比は最大でも50倍しかない。これはピリメサミン、シクログアニルに比べて低い値と言える。この結果はレコンビナントDHF Rを用いたスクリーニング系の実験結果との間に相関関係を示しており、構築した*in vitro* の実験系が抗マラリア剤のスクリーニング系として有用である事を示している。

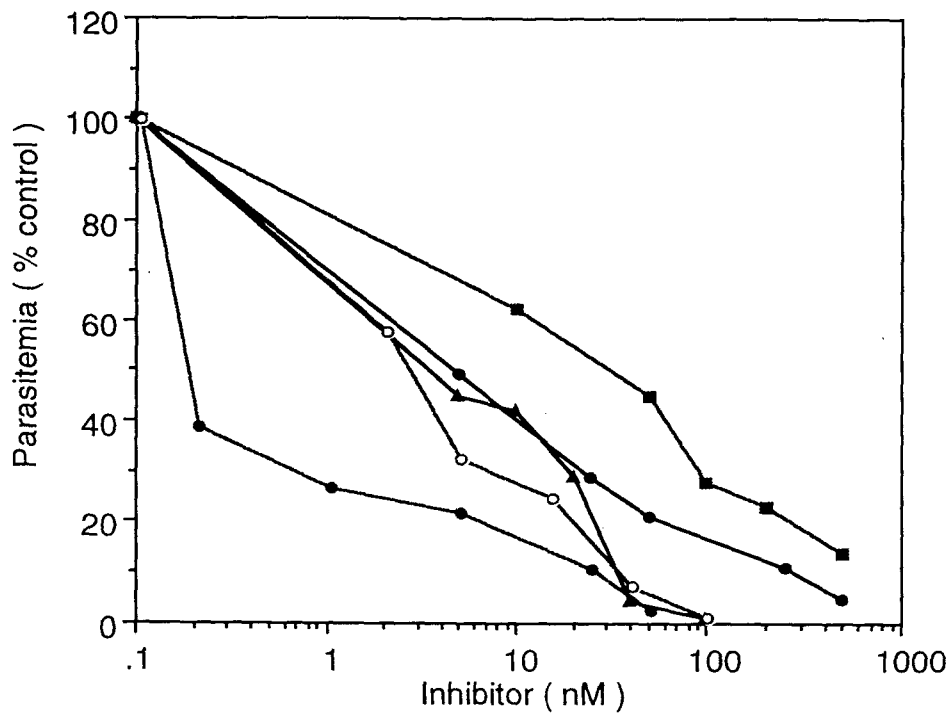


図 3-3 培養系におけるマラリア原虫 3D7 株の増殖阻害

0.1 から1000 nMにおける薬剤濃度下でマラリア原虫株 K1 株の増殖阻害効果が観測された。T-44160は(—■—)を, T-49172は(—○—)を, T-49372は(—▲—)を, T-55477は(—●—)を, T-64905は(—●—)を表す。実験条件は材料と方法に記す。

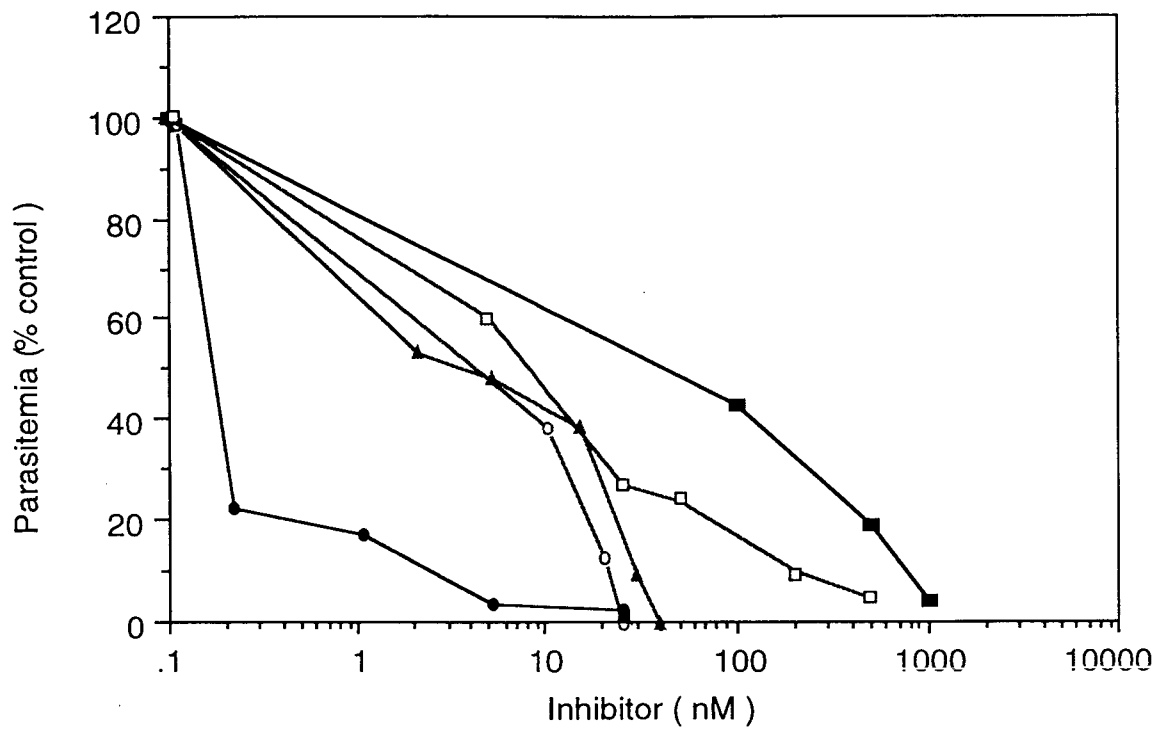


図 3-4 培養系におけるマラリア原虫 FCR 3 株の増殖阻害

0.1 から 1000 nM における薬剤濃度下でマラリア原虫株 FCR 3 株の増殖阻害効果を観測された。T-44160 は (—■—) を、T-49172 は (—▲—) を、T-49372 は (—○—) を、T-5547 は (—□—) を、T-64905 は (—●—) を表す。実験条件は材料と方法に記す。

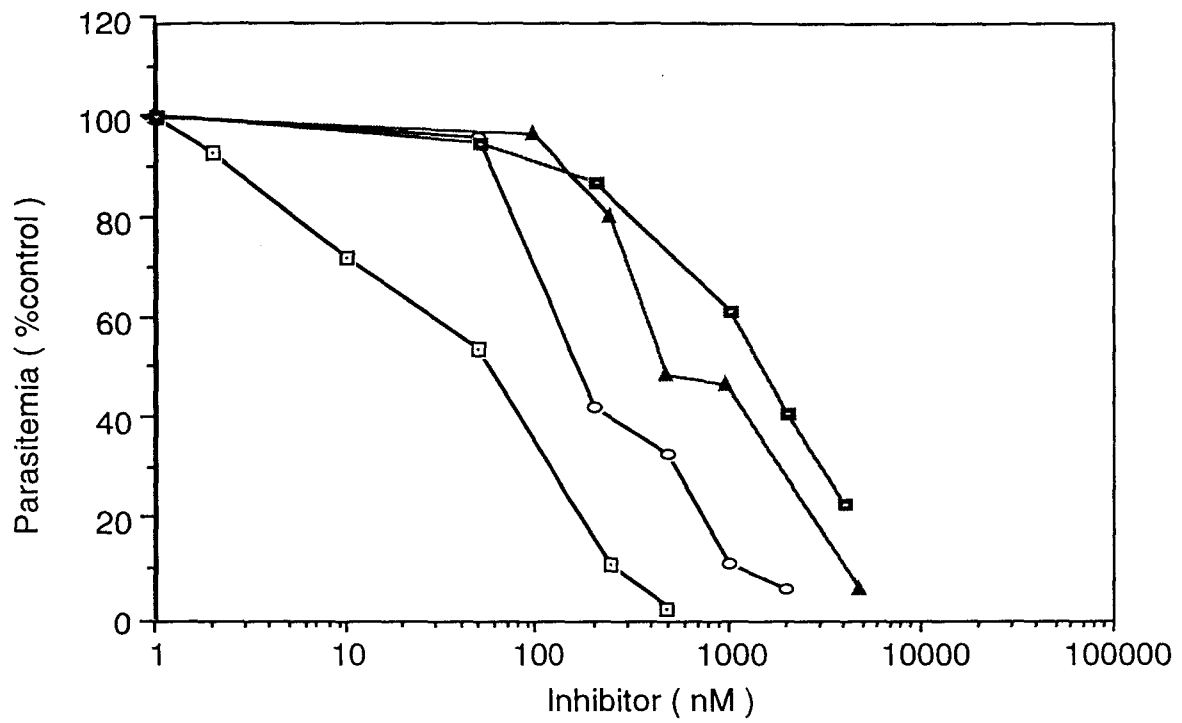


図 3-5 培養系におけるマラリア原虫 K1 株の増殖阻害

0.1 から 1000 nM における薬剤濃度下でマラリア原虫株 K1 株の増殖阻害効果が観測され

た。T-44160 は (—■—) を、T-49172 は (—●—) を、T-49372 は (—▲—) を、T-55477 は (—○—) を、T-64905 は (—□—) を表す。実験条件は材料と方法に記す。

Chemical compound	ID ₅₀ (nM)		
	3D7	FCR3	K1
Pyrimethamine	0.2	0.18	4100
Cycloguanil	0.29	200	130
T-44160	30	49	1500
T-49172	2.9	4.2	44
T-49372	3.4	4.0	48.5
T-64905	0.17	0.11	5.4
T-55477	4.9	9.3	160

表 3-4 各種阻害剤のマラリア原虫に対する増殖阻害効果
 pyrrolo[2,3-d]pyrimidime 誘導体と、ピリメサミン、シクログアニルのマラリア原虫に対する増殖阻害効果を3つの原虫株 3D7, FCR3, K1 に対して培養系において測定した。実験方法は材料と方法に記す。

考察

薬剤感受性型マラリアとウシDHFRに対する選択性が25 - 70 倍のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine誘導体を用いて薬剤耐性型マラリアDHFRの実験に用いた。これらの誘導体のIC₅₀はピリメサミン耐性型マラリアDHFRと薬剤感受性型の間で0.6 - 4.7 倍の開きがあり、一方シクログアニル耐性型と薬剤感受性型の間で1.0 - 2.5 倍の開きしかなかった。これはピリメサミンとシクログアニルが各々の耐性型と薬剤感受性の間で示した308 倍と400 倍の開きに比べかなり低い値であり、今回選び出されたpyrrolo[2,3-d]pyrimidine誘導体が薬剤耐性型マラリア原虫に有用である可能性を酵素レベルの実験で示した。4つの誘導体を用いて培養マラリア原虫の系で実際にマラリア原虫の増殖を抑えるかを調べたところ、レコンビナントDHFRを用いた上記の実験結果をほぼ反映する結果が得られた。シクログアニル耐性のFCR3株は薬剤感受性株の3D7株とほぼ同程度の増殖阻害を受けた。一方ピリメサミン耐性のK1株は14 倍から50 倍の耐性を持っている事を示しているが、ピリメサミン耐性のK1株は薬剤感受性株の3D7株と比較するとピリメサミンに対し20500 倍の耐性をもっており、これに比べると今回選び出された4つの誘導体は既存の薬剤耐性株に対し大変有効に作用しており、レコンビナントDHFRを用いたスクリーニングの系が非常に有効であることを示すものである。

今回スクリーニングに使用した約120種類のpyrrolo[2,3-d]pyrimidine誘導体は7カ所において修飾基が付加されており(図3-1)、DHFRに対する阻害活性だけでなく選択性にも変化を与えている(表3-2)。今回スクリーニングに使用した誘導体の数が少なく、誘導体の修飾基に対するはっきりとした傾向性を示すことはできなかったが、マラリアDHFRとウシDHFRの両方を強く阻害する誘導体のグループや逆に両方を弱く阻害する選択性の低い誘導体のグループと、マラリアDHFRを強く阻害し、ウシDHFRを中程度阻害するグループやマラリアDHFRを中程度に阻害し、ウシDHFRを弱く阻害するグループに、大まかに分けられた。このような知見を蓄積し、修飾基の立体構造と阻害効果と関連させ、それについての説明を他の生物種のDHFR三次元構造を基にコンピューター上に構築したマラリアDHFRの三次元構造モデルを使ってある程度はできるようになるかもしれない。またそれを用い、効果的な阻害剤のデザインや点突然変異が阻害剤との親和性に与える影響についてのある程度の説明をつけることが将来的に可能になるになると考えられる。第二章で点突然変異とそれに伴う酵素活性の変化についての説明が定性的になったのは残念ながら現在の技術水準では例えば酵素の活性中心と阻害剤との結合エネルギーを計算しても誤差の範囲が大きすぎて*in vivo*の実験系によって測定した実測値とかけ離れた値になってしまうためである。この技術的な限界を越えることができれば、例えば酵素の活性中心に強力に結合する化合物のデザインが可能になり、副作用の少ない新薬の開発が飛躍的に容易になる。それには*in vivo*の実験系による実測値にコンピューター上で計算した酵素の活性中心と阻害剤との結合エネルギーの計算値を近づけるように計算法を改善することが有効

な方法と思われ、そのためには第3章で行ったような *in vivo* の実験系によって測定した実測値の蓄積が不可欠である。

酵素レベルで測定したIC 50は反応系における酵素活性を半分に抑える薬剤濃度を示し、培養系レベルで測定したID 50は培養系におけるマラリア原虫の数を半分に抑える薬剤濃度を示す。2つの値を比較すると、3D7株ではIC 50 / ID 50の比率は6.4 - 86倍、FCR3株では8.1 - 121倍、K1株では0.22 - 31倍であった(表3-5)。全体にID 50よりIC 50の方が大きいのは原虫細胞中ではDHFRの基質であるジヒドロ葉酸とNADPHの濃度が*in vitro* 反応系(300 μ M)より少なく、またDHFR阻害剤はDHFRを拮抗的に阻害するために細胞中のDHFRは阻害剤に対して*in vitro* 反応系より阻害効果が出やすいためと推測される。

熱帯熱マラリアが点突然変異のみによってDHFR阻害剤に対する耐性を獲得しているのであれば各薬剤について、原虫株間のIC 50 / ID 50の比率は同じになると考えられる。今回の結果は大まかな傾向としては3D7株、FCR3株に比べ、K1株ではIC 50 / ID 50の比率が小さい。ただ、T-49172, T-49372についてはあまり変化はない。これは点突然変異以外に、DHFR阻害剤に対する耐性を向上させる要因が存在する可能性を示している。その場合、DHFR阻害剤の細胞膜透過性の変化による可能性は非常に小さいと考えられている(Dickman.A., and Jung.A., 1986)ので、残る可能性は標的酵素の量的増大と薬剤を化学的に修飾する酵素の存在である。もし標的酵素の量的増大があるとすればT-49172, T-49372についてもIC 50 / ID 50の比率に変化がでるはずであるが、あまり変化はないので、標的酵素の量的増大は考え難い。結局残る可能性としては薬剤の阻害効果を何らかの方法で不活性化する機構である。もしそのような機構が存在するとすれば細胞外の薬剤濃度の影響が細胞中では弱められ、高濃度の阻害剤でも増殖阻害は起きず、結果的にID 50は大きくなると予想される。K1株のIC 50 / ID 50の比率は3D7, FCR3より小さいが、K1株はそのような機構を持っているのかもしれない。またT-49172, T-49372についてはあまり変化がなかったのはその機構は2つの阻害剤に対応できなかった可能性が考えられる。

Chemical compound	IC ₅₀ / ID ₅₀		
	Ser 108 / 3D7	Val16 Thr108 / FCR3	Arg59 Asn108 / K1
Pyrimethamine	15	121	0.22
Cycloguanil	86	50	1.3
T-44160	17	8.1	0.22
T-49172	69	52	27
T-49372	9.4	12.8	31
T-64905	6.4	110	1.4

表 3-5 各種阻害剤の IC₅₀ と ID₅₀ との比較
マラリア DHFR に対する阻害定数とマラリア原虫に対する増殖阻害効果の比をまとめた。DHFR Ser108 はマラリア原虫 3D7 株に、DHFR Val16 Thr108 は FCR3 株に、DHFR Arg59 Asn108 は K1 株に対応させた。

参考文献

- Aso.K., Hitaka.T., Yukishige.K., Ootsu.K., and Akimoto.H., 1995 Synthesis and antitumor activity of pyrrolo[3-d] pyrimidine antifolates with a bridge chain containing a nitrogen atom. *Chem Pharm Bull* **43** 256-61
- Brobey.R.K.B., Sano.G., Itoh.F., Aso.K., Mitamura.T., and Horii.T., Novel pyrrolo(2,3-d pyrimidine antifolates screened by recombinant *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase inhibited the growth of drug resistant parasites *in vitro*. in preparation
- Garvey.E.P., Santi.D.V., 1985 Limited proteolysis of the bifunctional thymidilate syntase-dihydrofolate reductase from *Leishmania tropica* *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.***82** 7188-7192
- Inselburg.J., and Banyal.H.S., 1984 Synthesis of DNA during the asexual cycle of *Plasmodium falciparum* in culture. *Mol.Biochem.Parasitol.* **10**, 79-87
- Itoh.F., Russelo.O., Akimoto.H., and Beardsley.GP., 1994 Novel pyrrolo [2,3-d] pyrimidine antifolates TNP-351: cytotoxic effect on methotrexate-resistant CCRF-CEM cells and inhibition of transformylases of de novo purine biosynthesis. *Cancer Chemother Pharmacol* **34** 273-279
- Itoh.F., Yukishige.K., Wjima.M., Ootsu.K., and Akimoto.H., 1995 Non-glutamate type pyrrolo [2,3-d]pyrimidine antifolates. I: Synthesis and biological properties of pyrrolo [2,3-d]pyrimidine antifolates containing tetrazole congener of glutamic acid. *Chem Pharm Bull* **43** 230-235
- Lambros.C., and Vanderberg.JP., 1979 Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J.Parasitol* **65**, 418-420
- Mita.T., Hitata.T., Akimoto.H., and Nomura.H., 1991 Novel Pyrrolo [2,3-d] pyrimidine antifolates: synthesis and antitumor activities *J Med Chem* **34** 555-560
- Studier.F.W., Rosenberg.A.H., Dunn.J.J., and Dubendorff.J.W., 1990 Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **185** 60-89 *Methods in Enzymology*

Tager.W., Tershakovec.M., Lyandvert.L., Stanley.H., Lanners.N., and Gubert.E., 1981 Clones of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* obtained by microscopic selection: their characterization with regard to knobs, chloroquine sensitivity, and formation of gametocytes.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA **78** 6527-6530

Walliker.D., Quakyi.I.A., Wellems.T.E., McTchan.T.F, Szarman.A., W.T.London, L.M. Corcoran, T.R.Burkot, and R.Carter 1987 Genetic analysis of the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*

Science **236** 1661-1666