



Title	Recombinant <i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase-based <i>in vitro</i> screen for antifolate antimalarials
Author(s)	Brobey, Reynolds Kofi Baffour
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40712
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	ブロビー レイノルズ コフィ バフ
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13711 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	Recombinant <i>Plasmodium falciparum</i> dihydrofolate reductase-based in vitro screen for antifolate antimalarials. (レコンビナント熱帯熱マラリア原虫ジヒドロ葉酸還元酵素を用いた、試験管内での抗マラリア剤のスクリーニング)
論文審査委員	(主査) 教授 木下タロウ
	(副査) 教授 品川日出夫 教授 本田 武司

論文内容の要旨

【目的】

薬剤耐性マラリア原虫株の出現により、マラリアの治療と制圧が困難な状況に陥っているため、薬剤耐性マラリア原虫に効果的な新規抗マラリア剤の開発は急務である。培養マラリア原虫細胞を用いた増殖阻害実験や、動物を用いたマラリアの感染実験による薬剤のスクリーニングには莫大な設備と労力を必要とする。従って、本研究ではジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)をレコンビナント蛋白質として調製し、種々の化合物をスクリーニングできる系を確立し、新規抗マラリア剤のリード化合物の発見を目的とする。さらに、抗マラリア剤として使用されているピリメタミンおよびシクログアニルに対して、種々の耐性度を示す葉酸拮抗剤耐性型マラリア DHFR をレコンビナント蛋白質として調製し、その酵素学的な解析を行うとともに耐性型 DHFR に効果的なリード化合物の発見を目的とする。

【方法】

熱帯熱マラリア原虫においては、葉酸拮抗剤の標的酵素である DHFR は、チミジル酸合成酵素とともに一本のポリペプチド鎖上に存在する。このうち DHFR ドメイン (24kDa)をレコンビナントとして大腸菌で発現させるため、コドンを大腸菌型に変換して構築されたマラリア DHFR 人工合成遺伝子を用いて発現・精製を行った。また、葉酸拮抗剤耐性型 DHFR は、野生型マラリア DHFR 人工合成遺伝子の Ala¹⁶, Asn⁵¹, Cys⁵⁹, Ser¹⁰⁸, Ile¹⁶⁴ のアミノ酸残基をそれぞれ Val, Ile, Arg, Thr, Leu にそれぞれ変換し、これらを組み合わせることによって流行地域で単離されたすべての対立遺伝子型を創出した。

DHFR 活性では NADPH と DHF がそれぞれ NADP と THF (テトラヒドロ葉酸) に変換される反応が共役しているため、これら基質と反応産物の340nm における吸収変化を測定することによって定常状態の反応速度解析を行った。薬剤スクリーニングのための対照酵素として、ウシ DHFR (Sigma) および、ヒト DHFR を用いた。

論文審査の結果の要旨

薬剤耐性マラリア原虫株の出現によりマラリアの治療は、困難な状況に陥っている。現在、最も有効な抗マラリア

薬は中国の漢方薬に由来するアルテミシンであるが、これに対する耐性株の出現がすでに報告されている。一方、マラリア原虫を用いた新規薬剤のスクリーニングには膨大な資金を必要とし、各国の製薬会社は全く興味を示さない。このような状況に対して、本研究では葉酸拮抗剤の標的酵素であるマラリア原虫のジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）に着目し、組み換え遺伝子技術を用いて流行地域で単離された全7種類の葉酸拮抗剤耐性型 DHFR をレコンビナント蛋白質として精製し、それらの酵素反応論的解析を行い、これらに有効な阻害剤のスクリーニングの系を確立した。また、この系を用いて100種類を越える新規化合物のスクリーニングを行い、耐性株に対してもある程度有効な pyrrolo-pyrimidine の誘導体を発見した。さらに、培養マラリア原虫に対する毒性試験およびマウスを用いた動物実験において、これが極めて有望な抗マラリア剤のリード化合物であることを示した。本研究は緊急を要する課題である新規抗マラリア薬の開発に対して新たな研究方向を展開したとともに、有望なリード化合物を発見したものであり、学位を授与するに値するものと認める。