

氏 名 (本籍) もり 盛 さき 崎 だい 大 き 貴

学位の種類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬 博 第 3 9 2 号

学位授与年月日 平 成 19 年 3 月 27 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科  
(博士課程) 創薬化学専攻

学位論文題目

ロダシアニンの蛍光特性を利用する抗マラリア活性発現機構の  
解析

論文審査委員 (主 査) 教 授 徳 山 英 利  
教 授 大 島 吉 輝  
助教授 廣 谷 功

# 論文内容要旨

マラリアは *Plasmodium* 属の原虫により引き起こされる寄生虫感染症で、熱帯亜熱帯地方を中心に数億人の感染者が存在している。近年では薬剤耐性マラリア原虫が世界各地で蔓延しており、新たな抗マラリア薬の開発が世界的な重要課題となっている。当研究室ではこれまで新規抗マラリア薬の開発研究を行ってきた結果、ロダシアニン (1) などの非局在性カチオン (DLC) 化合物が強い抗マラリア活性を有することを見出している (Figure 1)。例えばロダシアニンのひとつ MKT-077 (2) は薬剤耐性マラリア原虫に対し *in vitro* で高い活性 ( $IC_{50} = 21 \text{ nM}$  against *P. falciparum* K1) を示す。しかしその活性発現機構は不明であり、さらなる創薬への展開にはその解明が望まれている。またロダシアニンは既存の抗マラリア薬とは大きく異なる化学構造を有していることから、これまでに知られていない新たな活性発現機構を持っていることが期待される。そこで著者はロダシアニンの抗マラリア活性発現機構を理解すべく研究を開始した。

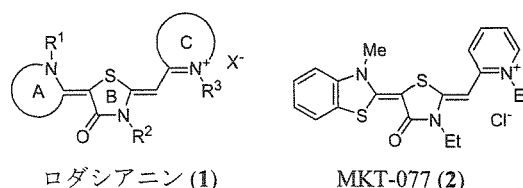


Figure 1. ロダシアニン

## 1. マラリア原虫におけるロダシアニンの蛍光集積

2 は蛍光を有していることから、マラリア原虫内でのロダシアニンの挙動を蛍光顕微鏡により観察できるのではないかと考え検討を行なった。マラリア感染マウス血液に MKT-077 を添加し蛍光顕微鏡で観察したところ 2 の蛍光集積を観察することができた (Figure 2a)。観察の結果、MKT-077 は速やかにマラリア原虫に取り込まれ原虫内の一部に局所的に集積することが分かった。続いて数種のロダシアニンについて同様に集積を観察したところ、抗マラリア活性と集積の度合いには良い相関があることがわかった。すなわち、高活性なロダシアニンはマラリア原虫の一部に局所的に集積するのに対し低活性なロダシアニンは原虫の細胞質全体に存在していた (Figure 2b)。すなわち、ロダシアニンはマラリア原虫の一部に特異的に集積することがその活性発現に関与していると考えられる。

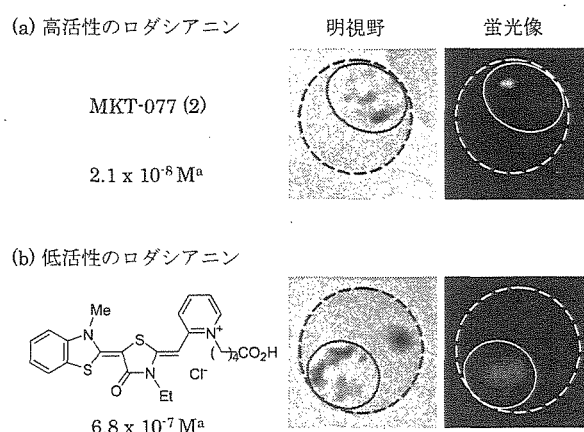


Figure 2. ロダシアニンの抗マラリア活性と集積  
破線は赤血球、実線はマラリア原虫を示す。  
<sup>a</sup>:  $IC_{50}$  against *P. falciparum* K1 (chloroquine resistance)

## 2. ロダシアニン蛍光プローブの開発

次にロダシアニン集積部位の同定を試みたが MKT-077 など既存のロダシアニンでは蛍光が弱いため集積部位の特定には至らなかった。そこで、既存のロダシアニンより強い蛍光を有し、より低濃度で集積観察可能な新規ロダシアニンを合成することを試みた。蛍光プローブは強い蛍光を持つことだけでな

く高い抗マラリア活性を持ちマラリア原虫の一部に局所的に集積することも求められる。

一般的に蛍光プローブを設計する時には、母核となる化合物の適切な位置に蛍光団を有する側鎖を導入することが多い。しかし、蛍光団の導入により母核化合物の物性や薬理活性が大きく変化するという問題がしばしば起こる。活性の低いロダシアニンは特異的に集積しないことが予想されるため、蛍光プローブとして著者の目的には合致しない。そこで今回はロダシアニンが本来有している蛍光を増強することを目指した。つまり、分子内で架橋することによりコンフォメーション固定を行えばロダシアニンの蛍光が強くなるのではないかと考えた。MKT-077 分子中の単結合 a, 二重結合 b の回転障害を意図して Type 1-3 のロダシアニンを設計した (Figure 3)<sup>1</sup>。Type 1 のロダシアニンは B 環と C 環の間のメチンと C 環部を架橋することにより、結合 a の自由回転を防げる設計である。Type 2 は環間メチンと B 環の窒素原子を架橋したロダシアニンであり、結合 b のシス-トランス変換を抑制している。Type 3 ロダシアニンは B 環, C 環それぞれの窒素原子を架橋することにより、結合 a, b 両方の回転異性を抑制している。

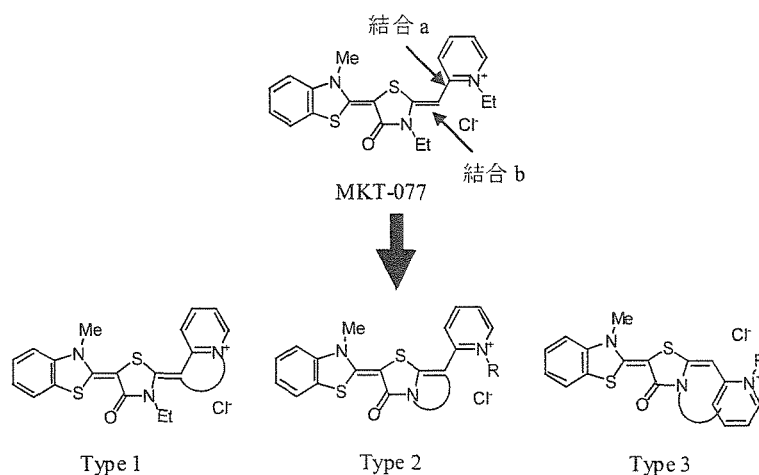
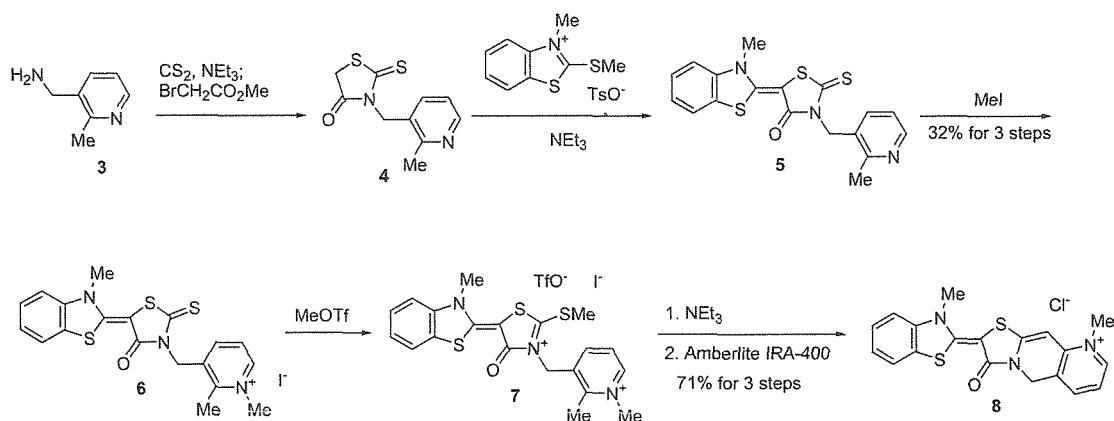


Figure 3. 架橋型ロダシアニンの設計

Type 3 架橋型ロダシアニンの合成例を Scheme に示す。3 を二硫化炭素及びブromo酢酸メチルと反応させることにより 4 を得た。この 4 をベンゾチアゾリウム塩と塩基存在下反応させ 5 とした。5 のピリジ



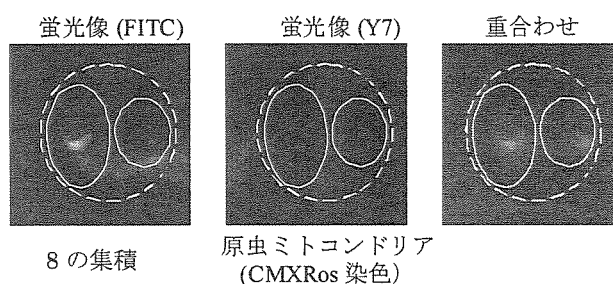
Scheme. Type 3 ロダシアニンの合成の一例

ン環窒素, チオカルボニル基をそれぞれメチル化してジカチオン7を得た。最後に塩基で処理し閉環させた後イオン交換樹脂でカウンターアニオンを塩化物イオンとすることにより目的の Type 3 ロダシアニン8を得た。

合成した架橋型ロダシアニンの蛍光の強さを測定したところ8はMKT-077と比較して量子収率が約100倍上昇していた。8をマラリア感染マウス血液に添加したところMKT-077と同様にマラリア原虫の一部に特異的に集積した。そしてマラリア原虫における蛍光集積が観察可能な濃度を検討した結果, 8はMKT-077と比較して1/100の濃度で集積の蛍光観察が可能であることが明らかとなった。

### 3. ロダシアニン集積部位の解明と機構解析

8を蛍光プローブとして用いて集積部位の同定を目指した。8とミトコンドリア蛍光染色剤マイトトラッカーレッドCMXRosをマラリア感染マウス血液に添加したのちマラリア原虫を蛍光顕微鏡で観察した(Figure 4)。その結果8の緑色の集積とCMXRosの赤色の集積はマラリア原虫内の同じ場所に存在していた。これによりロダシアニンはマラリア原虫のミトコンドリアに集積していることを示すことができた。即ち, これまでの実験結果を総合することによりロダシアニンはマラリア原虫のミトコンドリアに集積することで抗マラリア活性を発現していると考えられる。



**Figure 4.** ロダシアニン集積部位の特定  
破線は赤血球、実線はマラリア原虫を示す。

次にミトコンドリア阻害剤である CCCP やアンチマイシン A が8の集積に与える影響を検討した。その結果, これらの阻害剤は8のミトコンドリアへの集積に影響を与えなかった。

以上のように, 架橋型ロダシアニンを蛍光プローブとして用いることによりマラリア原虫におけるロダシアニンの集積部位がミトコンドリアであることを明らかにすることが出来た。そして, このミトコンドリアへの集積が抗マラリア活性発現に重要であることが示唆された。

また, 上記の研究過程において合成した架橋型ロダシアニンは高い抗マラリア活性と強い蛍光を併せ持っており, ロダシアニンの作用機序解明に用いる蛍光プローブとして有用である。また8は, 一部のミトコンドリア機能阻害剤存在下でもミトコンドリアを蛍光染色することから, 蛍光染色剤として有用ではないかと期待できる。

#### 【参考文献】

1. Takasu, K.; Morisaki, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Ihara, M. *Heterocycles* 2005, 66, 161-166.

## 審査結果の要旨

マラリアは熱帯性原虫感染症で、それにより毎年数百万人が命を落としている。近年では薬剤耐性原虫の出現が世界的な重要問題となっており、既存の薬剤とは異なる作用機序を有する新規抗マラリア薬の開発が強く求められている。そのような状況の中、井原、高須らはカチオン性化合物ロダシアニン (RC) が *in vitro* で薬剤耐性原虫にも高い活性を示すことを見出している。例えば、RC の 1 つ MKT-077 は薬剤耐性熱帯熱マラリア原虫に対し *in vitro* で  $IC_{50} = 21 \text{ nM}$  と高い活性を示す。しかしその活性発現機構は不明であり、さらなる創薬への展開にはその解明が望まれる。また RC は既存の抗マラリア薬とは大きく異なる化学構造を有していることから、新規な活性発現機構を持っていることが期待される。そこで論文提出者は、RC の抗マラリア活性発現機構を理解すべく研究を行なった。

論文提出者は、蛍光顕微鏡による観察から RC がマラリア原虫の一部に集積することを見出した。そして RC の抗マラリア活性とその集積には良好な相関があり、高活性な RC ほど局所的に集積することを発見した。つまり、RC は原虫の一部に特異的に集積することで活性を発現していることが明らかとなった。しかしながら、既存の RC は蛍光が弱いため、集積を観察する際高濃度を用いる必要があり、そのため集積について詳細な解析をするには至らなかった。そこで低濃度でも観察可能な蛍光の強い RC を設計合成し、これを蛍光プローブとして用いることで特異的集積現象の解明を目指した。

一般に蛍光プローブを設計する際、活性化合物の置換基に蛍光団を導入することが多い。しかしこの従来法では蛍光団の導入により活性が低下し、プローブとして適さなくなることが多い。そこで本研究では、蛍光団を導入するかわりに分子内に架橋構造を形成し分子の剛直性を高めることで分子自体の蛍光を強めることができると考え、いくつかの架橋型 RC を設計し合成した。架橋型 RC は期待通り既存の RC より強い蛍光を有し、なおかつ高い抗マラリア活性を有しており、原虫の一部に集積した。集積観察可能な濃度を検討したところ、最も良い化合物では既存の RC より 1/100 の低い濃度で集積観察が可能であり、本化合物を蛍光プローブとして採用した。

合成した架橋型 RC を用い二重染色試験などを行なった結果、RC はマラリア原虫のミトコンドリアに集積していることが明らかになった。また、マラリア感染マウスに架橋型 RC を投与した後血液を観察することで、実際に、宿主動物生体内でも RC はマラリア原虫に速やかに取り込まれその一部に集積していることを確認した。

以上要するに、本研究では、新たな設計により RC の蛍光プローブとしての機能の著しい向上に成功し、これを用いて、これまで不明だった RC の標的がマラリア原虫ミトコンドリアであることを明らかにした。本結果は抗マラリア薬の開発に関して大きな進展をもたらすものであり、薬学分野の発展に寄与するところ大である。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。