

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)
(英語) International Collaborative Research Program
Science and Technology Research Partnership for Sustainable
Development (SATREPS)

研究開発課題名：(日本語) インドネシアの生物資源多様性を利用した抗マラリア・抗アメーバ新規
薬剤リード化合物の探索
(英語) The Project for Searching Lead Compound of Anti-Malarial and Anti-
Amebic Agents by Utilizing Diversity of Indonesian Bio-resources

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人筑波大学大学院 生命環境科学研究科 教授 野崎智義
所属 役職 氏名：(英語) Graduate school of life and Environmental Sciences, University of
Tsukuba, Professor Tomoyoshi Nozaki

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 赤痢アメーバ創薬
開発課題名：(英語) Development of antiamebic compounds

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人筑波大学大学院 生命環境科学研究科 教授 野崎智義
所属 役職 氏名：(英語) Graduate school of life and Environmental Sciences, University of
Tsukuba, Professor Tomoyoshi Nozaki

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(1) 研究開発成果の概要

赤痢アメーバ症に対する新しい薬剤の創成を目指し、インドネシアの多様な微生物資源を利用し、酵素阻害活性と抗原虫活性をもつ新規阻害剤の探索、精製を目指し研究開発を実施した。赤痢アメーバの標的酵素の調整法・アッセイ法・ハイスループットスクリーニング系を確立・改良を実施し、インドネシア側に技術移転した。一次スクリーニングにより、放線菌・真菌等の微生物培養抽出液 2240 から、赤痢アメーバの組換え酵素 CS3, SAT1 を阻害するものを 0.7-1.3%選択した。同時に 1,240 の微生物培養抽出液から、原虫の増殖を阻害するものを一次スクリーニングし、増殖阻害活性を示す抽出液を 3.9%選択した。更に初年度 CS 阻害活性を示した陽性抽出液を二次スクリーニングし、大部分に関して阻害を確認した。

また、インドネシア側への技術支援を本邦での技術研修と先方での実地指導の形で継続的に実施した。

(2) 研究開発項目の実施状況及びマイルストーンの達成状況

(研究開発計画書のⅡ.2. 担当別 研究開発概要に対応)

1. 赤痢アメーバ酵素阻害物質スクリーニング

赤痢アメーバ標的酵素である CS, SAT のうち、CS3, SAT1/3 の調整法の至適化を終えた。また、CS3, SAT1/3 のアッセイ法・ハイスループットスクリーニング系を改良し、実施した。以上の酵素組換え体に対して 2240 の微生物抽出液(糸状菌・放線菌)の阻害活性をスクリーニングした。その結果、一次スケジュールで 21 の CS3 阻害活性をもつ抽出液、28 の SAT1 阻害活性をもつ抽出液を選択した。ヒット率は 0.7, 1.3%であった。CS に対しては 2 年間で目標の 1 万に近い 7 千以上のスクリーニングを終了した。また、H27 年度に CS1/3 に対する一次スクリーニングにより阻害活性を示した 33 検体のうち、二次スクリーニングとして 15 検体をバイオテックセンターで再培養し、そのうち 13 サンプルについて、CS 阻害活性を再確認した。これらの検体は阻害剤の精製と同定を目的として、北里大学に情報提供された。同時に、酵素合成、スクリーニングプロトコルの品質管理技術のインドネシア側への支援を本邦での技術研修と先方での実地指導の形で継続的に実施した。

2. 赤痢アメーバ増殖阻害物質スクリーニング

赤痢アメーバのインビトロ培養系を用いた増殖アッセイ法・ハイスループットスクリーニング系を用いて、約 1,240 の微生物(放線菌・真菌)の培養抽出液から、赤痢アメーバ原虫の増殖を阻害するものを 48 選択した。陽性率は 3.9%であった。そのうち 32 の抽出液に関しては限界希釈により、阻害の強弱を比較し、精製のプライオリティを決定した。また、昨年度一次スクリーニングにより赤痢アメーバ増殖阻害活性のあると判断されたものから 5 検体を選び、培養チーム・精製チーム (バイオテックセンター、北里大学) に情報提供した。細胞ベーススクリーニングは技術移転の遅れからやや遅滞しており、2 年間で 2 千弱が終了している。同時に、インドネシア側への分子生物学・細胞化学に係る技術支援を本邦での技術研修と先方での実地指導の形で継続的に実施した。

3. 生物資源収集指導及び大量生産指導

インドネシアの多様な生物資源を利用するため、インドネシアの自然環境から採取したサンプルを使いインドネシアの気候に適合した分離・培養方法等で微生物等の生物資源を収集・保存する技術指導を行った。本年度は Papua 州の Biak 島にて 60 種の土壌・植物から 405 の放線菌と 478 の真菌、計 883 検体を分離する際に必要な技術供与を行った。予定通り、2 年間で新規微生物 2 千を獲得した。

Abstract

We conducted research on screening of microbial extracts that show inhibitory effects on *Entamoeba*-specific metabolic enzymes and cell growth in order to develop new chemotherapeutics against amebiasis, utilizing microbial resources from Indonesia, which has tremendous metabiodiversity. We have improved enzyme preparation protocols, standard operational procedures for assays and high throughput screening. We screened 2240 microbial extracts from fungi and actinomycetes in the primary screening against recombinant cysteine synthase (CS) 3 and serine acetyltransferase (SAT)1 from *Entamoeba histolytica*. We obtained 21 extracts that showed CS3 inhibitory effects and 28 extracts that showed inhibition against SAT1. The hit rate for CS3 and SAT1 was 0.7 and 1.3%, respectively. We completed screening of over 7,000 extracts for CS as initially scheduled. We also completed secondary (confirmatory) screening of 33 hit extracts (which passed the primary screening), and confirmed CS inhibition for 13 out of 15 tested. We shared the information with microbe and

purification teams at Biotech Center and Kitasato University. We conducted primary cell-based screening of 1,240 extracts for growth inhibitory effects, and identified 48 extracts (3.9%) that showed significant static or cidal effects against in vitro culture of *E. histolytica* trophozoites. Among these, inhibitory effects of the 32 extracts were further analyzed by serial dilution of the samples to prioritize further purification order. We also conducted technology transfer and training for enzyme production, enzyme- and cell based-assays, molecular biology, biochemistry, and cell biology in Japan and Indonesia. In addition, we gave advice on microbial collection in Biak, Papua, Indonesia, where the microbe team collected 60 soil and plant samples and isolated 405 actinomycetes and 478 fungi. In last two years approximately 2,000 new microbes were isolated as scheduled.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 1件）

1. 野崎智義 (2017) 原虫の特殊代謝経路を標的とした国際共同創薬研究、化学療法の領域 33, 438-445, 2017, 医薬ジャーナル社
2. Chiba, Y., Makiuchi, T., Jeelani, G., and Nozaki, T. Heterogeneity of the serine synthetic pathway in *Entamoeba* species. *Mol Biochem Parasitol.* 207(2):56-60, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 森美穂子, 中野由美子, 柘植聡志, 大村智, 塩見和朗, 野崎智義. 糸状菌代謝産物 ovalicin は赤痢アメーバ症肝膿瘍モデルハムスターに対して治療効果を示す. 日本農芸化学会 2017 年大会. 2017 年 3 月 17 日-20 日. 京都、国内、口頭、農芸化学会トピック賞受賞、日経産業新聞 2017 年 4 月 12 日に掲載
2. Arif Nurkanto, Ghulam Jeelani, and Tomoyoshi Nozaki. Coenzyme A biosynthetic pathway in enteric protozoan parasites *Entamoeba histolytica*: A potential target for drug development. The 7th EMBO meeting 2016, September 10-13, 2016, Mannheim, Germany、国外、ポスター.
3. Jeelani G, Mori M, Shiomi K, Nozaki T. Functional analysis of cysteine biosynthetic pathway in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 7th EMBO meeting 2016, Sept 10-13, 2016, Mannheim, Germany、国外、ポスター.
4. Jeelani G, Nozaki T. Metabolomic analysis of *Entamoeba*. AMOEBAC Review meeting, Nov 1-2, 2016. Indian National Science Academy, New Delhi, India. Saito-Nakano Y, Nozaki T. Isolation of new drug target on *Entamoeba histolytica*: Ursolic Acid and Miltefosine. NICED-NIID Joint meeting, 12th, Dec, 2016. Kolkata, India、国外、口頭.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

該当無し

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)
(英語) International Collaborative Research Program
Science and Technology Research Partnership for Sustainable
Development (SATREPS)
- 研究開発課題名：(日本語) インドネシアの生物資源多様性を利用した抗マラリア・抗アメーバ新規薬
剤リード化合物の探索
(英語) The Project for Searching Lead Compound of Anti-Malarial and Anti-
Amebic Agents by Utilizing Diversity of Indonesian Bio-resources
- 研究開発担当者 (日本語) 北里大学北里生命科学研究所 教授 塩見和朗
所属 役職 氏名：(英語) Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
Professor, Kazuro Shiomi
- 実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 抗原虫活性物質の精製・単離・構造決定
開発課題名：(英語) Isolation, Purification and Structure Elucidation of Anti-Protozoan
Agents
- 研究開発分担者 (日本語) 北里大学北里生命科学研究所 教授 塩見和朗
所属 役職 氏名：(英語) Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University
Professor, Kazuro Shiomi

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立大学法人筑波大学・生命環境科学研究科・野崎智義 総括研究報告を参照。

平成 28 年度前半に精製に用いる機材は概ね導入され、日本と同様に化合物精製を進めることが可能となった。北里からは 4 月から 2 ヶ月間、9 月と 1 月にそれぞれ 3 週間、3 月に 10 日間、研究者 2 名を派遣して精製及び微生物培養の指導と機材のセットアップを行った。

平成 28 年度後半には Biotech Center より精製担当または微生物培養担当の研究者計 5 名を随時北里大学に受け入れ、それぞれ約 1 ヶ月間専門分野の研究指導を行った。

抗原虫活性物質の探索研究に関し、インドネシアでは微生物培養液からマラリア DHODH に対し弱い阻害活性を示す 1 化合物を単離した。この研究結果について Biotech Center の研究者 1 名が修士論文としてまとめ、インドネシア大学で修士の学位を取得した。日本ではマラリア MQO を阻害する微生物培養液のスクリーニングを進めた。さらにインドネシア産の植物サンプルからもマラリア MQO 阻害化合物を見出した。

微生物資源の収集と保存に関しては、インドネシア東部のパプア州ビアク島で Biotech Center の研究者とともに土壌採集を行った。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 微生物代謝産物からの赤痢アメーバ症治療薬シーズの探索，口頭，森 美穂子，つくば市，第 27 回新薬創製談話会，2016/8/31，国内。
2. Screening and isolation of antiparasitic compounds from secondary metabolites of microorganisms，口頭，森 美穂子，New Delhi，赤痢アメーバ症会議，2016/11/1，海外 (India)。
3. 微生物二次代謝産物と感染症，口頭，塩見和朗，和光市，理研シンポジウム：次世代微生物化学ワークショップ，2017/1/6，国内。
4. 糸状菌代謝産物 ovalicin は赤痢アメーバ症肝膿瘍モデルハムスターに対して治療効果を示す，口頭，森 美穂子，中野由美子，柘植聡志，大村 智，塩見和朗，野崎智義，京都市，日本農芸化学会 2017 年度大会，2017/3/19，国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

上記 4. の日本農芸化学会 2017 年度大会においてトピックス賞に選出された。日本農芸化学会においては、トピックス賞に選出された研究は、内容を一般向けにわかりやすくまとめ直したものが別途トピックス集の冊子に収録される。この冊子が一般報道関係者に対し学会期間中に配布された。

(4) 特許出願

出願なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS)
(英語) International Collaborative Research Program
Science and Technology Research Partnership for Sustainable
Development (SATREPS)

研究開発課題名：(日本語) インドネシアの生物資源多様性を利用した抗マラリア・抗アメーバ新規
薬剤リード化合物の探索
(英語) The Project for Searching Lead Compound of Anti-Malarial and Anti-
Amebic Agents by Utilizing Diversity of Indonesian Bio-resources

研究開発担当者 (日本語) 長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・助教 稲岡 健ダニエル
所属 役職 氏名：(英語) Nagasaki University, School of Tropical Medicine & Global Health
Assistant Professor, Inaoka Ken Daniel

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) マラリア創薬
開発課題名：(英語) Searching lead compounds of anti-malarial utilizing diversity of
Indonesian Bio-resources.

研究開発分担者 (日本語) 長崎大学・熱帯医学・グローバルヘルス研究科・助教 稲岡 健ダニエル
所属 役職 氏名：(英語) Nagasaki University School of Tropical Medicine & Global Health

II. 成果の概要 (総括研究報告)

(1) 研究開発成果の概要

インドネシアは世界有数の生物多様性と生物資源価値を有するが、創薬等への応用に必要な学問・技術分野の基盤が国内に育成されていない。このため国際的に問題となるマラリアを始めとする感染症の制圧に不可欠な新規薬剤の開発力が不十分である。本研究はインドネシアの有する極めて多様な生物資源の価値と、天然生物資源から新規薬剤を創成する日本の知的基盤と最先端技術とを融合し、地球規模で重要な感染症であるマラリアと赤痢アメーバ症に対する新規創薬を目指し、抗原虫活性をもつ新規リード化合物の探索、精製、構造決定を行うことを目的としている。

本研究構想の具体的なゴールとしては以下が挙げられる。

1. インドネシア国内の微生物資源ライブラリーを利用して、抗マラリア・抗赤痢アメーバ特異酵素を阻害する微生物培養抽出液のスクリーニング、有効化合物の精製・構造決定を達成し、両原虫症に対し動物モデルで治療効果を示す創薬リード化合物を2剤以上同定する。
2. 同様のリード探索を標的酵素の阻害活性でなく、原虫培養系の増殖阻害・殺滅効果を指標に行い、両疾患に対し動物モデルで治療効果を示す創薬リード化合物を2剤以上同定する。

以上の具体的な目標の達成により、

3. インドネシアにおける微生物資源ライブラリーの整備・応用を可能とする。更に、今後の自国の創薬研究に不可欠な評価系の確立、有用化合物の同定と精製の技術の移転、構造解析や薬効の動物モデルでの評価系などの知的・技術的基盤を確立することを目指している。

当該年度は以下を達成した。日本側研究者をインドネシアに派遣し、インドネシア国内の Biotech Center (BC) で研究開発指導を行った。具体的には長崎大学から稲岡氏が H28 の 7/28 日-9/12 日（その内 8/13-19 日はスラバヤへ派遣期間）と H29 の 1/12 日-2/19 日（その内 2/5-7 日はスラバヤへ派遣期間）の期間インドネシア（BC 及び AU）へ派遣した。H28 の 7/28 日-9/12 日の期間では、SATREPS 予算で購入した機材の設置と動作確認を行い、速やかに新しい機材で熱帯熱マラリア原虫及び赤痢アメーバの標的酵素の大量発現系を BC で確立し、標的酵素群の精製及び活性測定を新規機材で行い、HTS の系を現地で立ち上げ、スクリーニングと技術移転を開始した。同様にスラバヤ派遣期間は機材の設置及び動作確認を行い、新しい機材で抗アメーバ標的酵素系の大量発現及び精製法を Airlangga 大学(AU)で確立し、スクリーニング系を立ち上げた。H29 の 1/12 日-2/19 日の期間では、微生物抽出物を用いたスクリーニング系を立ち上げ、実施した。さらに、長崎大学は宮崎氏を H28 の 7/28 日-9/12 日と H29 の 1/14 日-3/11 日の期間インドネシア（BC）へ派遣した。H28 の 7/28 日-9/12 日の期間では、SATREPS 予算で購入した原虫及びヒト細胞培養系の機材の設置と動作確認を行い、速やかに新しい機材で熱帯熱マラリア原虫及びヒト細胞培養の立ち上げ、冷凍ストック作成と維持培養系を BC で確立した。標的酵素群の精製及び活性測定を新規機材で行い、HTS の系を現地で立ち上げ、スクリーニングと技術移転を開始した。H29 の 1/14 日-3/11 日の期間では、実際に原虫を用いたスクリーニング系の立ち上げと、ヒト細胞を用いた細胞毒性試験の評価系を立ち上げた。昨年度は稲岡氏の東京大学から長崎大学への異動により、熱帯熱マラリア関係の本邦での研修は行わなかった。

インドネシア国内では Biotech Center (BC) を中心とした、本邦での技術研修を行った。BC より、のべ 6 名の研究者を 1-2 ヶ月筑波大、北里大、東京大で酵素アッセイ、細胞培養、精製等の初期研修を行った。これらは JICA の予算で負担された。更に、BC に保存されている微生物資源の一部に関して再培養を試み、高い生存率を確認した。更に BC および AU から H28 年度以降に短期研修派遣する人材の選考を行った。

（2）研究開発項目の実施状況及びマイルストーンの達成状況

（研究開発計画書の II.2. 担当別 研究開発概要に対応）

当該年度では、当初の計画より多い成果を得た。当初計画していた本邦での研修は、長崎大学で行うより遥かに効率的である、実際に現地で新たに導入した機材を用いて研究の指導を、研究開始以降初めて行う事が出来た。PfDHODH に関しては新たな精製方法を開発し、低コストで大量精製が出来るようになり、その技術を H28 年 1-3 月の間で BC 側に移転してある。PfMQO に関しても H27 年に安定性の問題を解決した後、H28 年度には大量に PfMQO を含む大腸菌膜画分を現地に新たに導入した超遠心機を用いて、調製と保存する事が出来るようになり、現地で長期間にわたって安定的に PfMQO のスクリーニングが可能になった。H28 年度には PfNDH2 を用いてスクリーニング系を長崎で確立した。H29 年度には実際に BC においても、PfNDH2 のスクリーニング系を立ち上げ開始する事を計画している。

機材の導入のおかげで、H28 年度は原虫及びヒト細胞の培養系の立ち上げと、実際にスクリーニング

を現地で開始する事が出来、本プロジェクトにおいて極めて重要なマイルストーンを達成した。

さらに、北里大学と連携して、H27年度で見出した PfDHODH を阻害する微生物抽出液から BC にて阻害物質の精製を開始した。

PfNDH2 や PfMQO はトキソプラズマ症、クリプトスポリジウム症、ピロリ菌、エイメリア症やパーキンソンス症など臨床的・産業的に重要な病原体に広く保存されており、ヒトや家畜には保存されて無い呼吸鎖酵素である。そのため、PfNDH2 や PfMQO の阻害剤の発見は将来的に広域スペクトルを持つ新規薬剤に繋がる可能性は高い。本研究で開発した精製方法からスクリーニング系の多くは前例のない独創的な研究であり、当研究で標的にしているマラリアやアメーバの他に上記に述べた病原体の創薬研究にも極めて大きなインパクトを与え、他分野においても貢献する事に間違いない。

以上、当該年度予定されていたすべての計画が予定通りに実施され、H28年の目標を達成したと考えている。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 1件)

1. Inaoka DK, Iida M, Tabuchi T, Honma T, Lee N, Hashimoto S, Matsuoka S, Kuranaga T, Sato K, Shiba T, Sakamoto K, Balogun EO, Suzuki S, Nara T, Rocha JR, Montanari CA, Tanaka A, Inoue M, Kita K, Harada S. The Open Form Inducer Approach for Structure-Based Drug Design. 2016 (査読有) . PLoS One. 11(11):e0167078.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Characterization of *Plasmodium falciparum* mitochondrial malate:quinone oxidoreductase. 口頭、Daniel Ken Inaoka, Russell Miller, Keisuke Komatsuya, Emmanuel O. Balogun, Eri Amalia, Hiroyuki Saimoto, Yohichi Watanabe, Dan Sato, Tomoyoshi Nozaki, Tomoo Shiba, Shigeharu Harada and Kiyoshi Kita. The 18th Forum Cheju, 2016, Daejeon Korea, 28 - 30 October 2016. 国外。
2. Functional expression of mitochondrial malate:quinone oxidoreductase from *Plasmodium falciparum* in bacterial membrane and identification of nanomolar inhibitor. ポスター。Daniel Ken Inaoka, Russell Miller, Marie Kuroda, Keisuke Komatsuya, Emmanuel O Balogun, Eri Amalia, Hiroyuki Saimoto, Yoichi Watanabe, Kazuro Shiomi, Tomoyoshi Nozaki, Tomoo Shiba, Shigeharu Harada and Kiyoshi Kita. The XIX International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2016, Brisbane, Australia, 18 – 22 September. 国外。
3. Siccanin is a potent and selective inhibitor of *Plasmodium falciparum* mitochondrial complex II and complex III. ポスター。Keisuke Komatsuya, Daniel Ken Inaoka, Kazuhiro Shiomi, Satoshi Ohmura, Tomoyoshi Nozaki and Kiyoshi Kita. The XIX International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2016, Brisbane, Australia, 18 – 22 September. 国外。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当無し

(4) 特許出願

該当無し