136　耐性化のない抗マラリア薬開発に向けたPfCRTの機能解析	樹下　成信

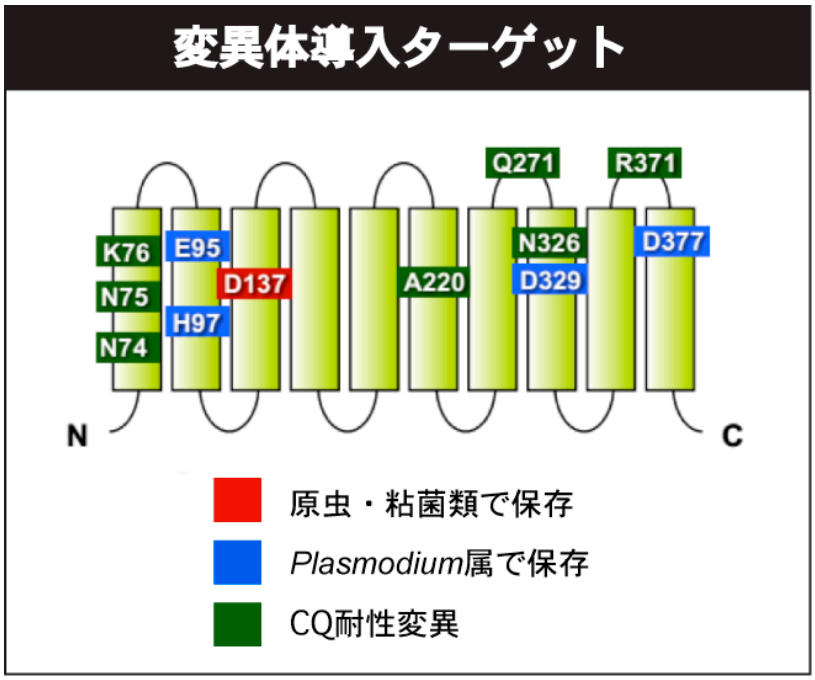
【目的】マラリアはマラリア原虫の感染により毎年数億人が罹患し、数百万人が死亡する、人類に取り最悪の感染症である。 Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter（PfCRT）はマラリア原虫にクロロキン耐性を付与する膜タンパク質である。マラリア原虫の薬剤耐性に主要な役割を果たすと考えられているが、生理的意義が不明であり、薬剤耐性に有効な抗マラリア原虫薬を開発する上で大きな障害となっていた。我々は最近、この問題をブレイクスルーし、PfCRT の本性を見いだした。すなわち PfCRT はアミノ酸等の食胞内で精製される栄養物の排出体することを明らかにした（PNAS 112, 3356（2015））。

さらに耐性化のない抗マラリア薬作製のため、部位特異的変異導入法を用いた解析から、輸送に必須なアミノ酸残基を同定するため、粘菌や他の原虫の PfCRT を系統的に遺伝子比較したことで、必須アミノ酸の同定と、その役割を解明した。

【方法】膜貫通領域の電荷のあるアミノ酸残基を中心に、部位特異的変異導入した変異体コンストラクトを作製した（下図）。PfCRT を大腸菌へ大量発現・精製し、既に構築した輸送活性測定系を用いて速度論的に解析した。

【結果】一つのアミノ酸残基で有意に活性が低下し、さらにその部位を詳細に検討した結果、プロトンの授受に関わるアミノ酸であることがわかった。

今回作製した変異体導入部位



136. 耐性化のない抗マラリア薬開発に向けた PfCRT の機能解析

樹下　成信

岡山大学 自然生命科学研究支援センター

Key words：マラリア原虫，PfCRT，抗マラリア薬

緒　言

マラリアは、ハマダラカ（Anopheles spp.）の吸血に伴って熱帯熱マラリア原虫（Plasmodium 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）のいずれかのスポロゾイト（sporozoite）が人体内に注入され感染が引き起こされる急性の熱性疾患で、熱帯、亜熱帯でハマダラカが分布している全域で流行している。世界人口の約 40%がマラリア流行地に居住し、発症の危険にさらされ、小児を中心に 200～300 万人が毎年死亡している。

マラリアの中でも、特に重篤になりやすいのが熱帯熱マラリアである。ハマダラカから注入された熱帯熱マラリア原虫のスポロゾイト（sporozoite）（一倍体）は肝細胞内に侵入し、赤外型の発育（exo-erythrocytic schizogony）を行い、約 1 週間で多数のメロゾイト（merozoite）を流血中に放出する。メロゾイト（一倍体）は赤血球に侵入し赤内型の発育（erythrocytic schizogony）を開始し、約 48 時間周期（この周期は三日熱マラリア、卵型マラリアほど厳密ではなく、熱型が不明瞭になることが多い）で感染赤血球を破壊し、メロゾイトを放出する。このメロゾイト放出時に発熱が起こる。放出されたメロゾイトは再び赤血球に侵入し赤内型発育を繰り返す。赤血球内に存在するヘマチンは、H_2O_2 や OH ラジカルなどの活性酸素腫を発生し、細胞膜機能を傷害する有毒な物質である。そのため、マラリア原虫は有毒なヘマチンを重合しヘモゾインとすることによって無毒化している。

クロロキンはこれまで、熱帯熱マラリアに対する有効な治療薬として用いられてきた。クロロキンは弱塩基性であり、単純拡散によって消化胞膜を通過する。消化胞内は酸性であるため、クロロキンはプロトン化され CQH_2^{2+} となり膜を透過できず、消化胞内に蓄積する。蓄積したクロロキンはヘモゾインの形成を阻害し、無毒化機構を妨害することによって原虫に対する効果を発揮すると考えられている。しかし近年、多くのマラリア原虫がクロロキン耐性を獲得しており、問題となっている。また、一昨年のノーベル賞をとった抗マラリア薬アーテミシンに対しても耐性株が出てきており、非常に大きな問題となっている。

マラリア原虫クロロキン耐性トランスポーター（PfCRT）は、熱帯熱マラリア原虫に、クロロキン耐性を発生させるトランスポーターである。10 回膜貫通型の膜タンパク質で、424 残基のアミノ酸から構成される。我々は先行研究で、このトランスポーターが薬剤耐性株、薬剤感受性株でどのように輸送等が変化しているのか。そもそも、PfCRT は何を基質とするトランスポーターなのかを明らかにした。これによると、PfCRT は栄養素の輸送体で、食胞内で分解された栄養分の排出体であること。薬剤感受性型も耐性型も共に抗マラリア薬を輸送すること。耐性化の原因は基質輸送の親和性の変化に伴う輸送量の違いであること。がその理由であることがわかった。

そこで、本研究では、上記の研究をさらに発展させるため、特異的変異導入法をもちいて、PfCRT の輸送に必須なアミノ酸残基の同定を行い、その役割を速度論的に解析したことから、ここに報告する。

方　法

1. PfCRT 変異体の作製

pETBB PfCRT をテンプレートとし、それぞれの残基を置換した変異体を作製した。変異導入は Megaprimer 法を用いて行った。*pETBB PfCRT* プラスミド 1.0 µL に、10 µM センスプライマー（Fw プライマー）、10 µM アンチセンス

プライマー（Rv プライマー）をそれぞれ 1.0 µL、PrimeSTAR Max Premix（2×） 25 µL、DDW 22 µL を加え、全量 50 µL として PCR 増幅を行った。D137H、C101F、D137N 変異体は、98℃（10 秒）、55℃（15 秒）、72℃（1 分 5 秒）を 30 サイクル繰り返し、72℃で 5 分間反応させた。L272F 変異体は、98℃（10 秒）、65℃（15 秒）、72℃（1 分 5 秒）を 30 サイクル繰り返し、72℃で 5 分間反応させた。作製した変異体はシークエンスにより確認した。

2. PfCRT 変異体のタンパク質精製

大腸菌 C43 株 45 µL に、10 倍に希釈したプラスミド DNA 1 µL を加え、30 分間氷上に置き、42℃で 45 秒温め、すぐ氷上に戻し、LB 培地 45 µL を加え、37℃で 1 時間振盪した。30 µg/mL Km プレートに広げ、37℃で一晩培養した。得られたコロニーを LB 培地 5 mL（30 µg / mL Km）に加え、37℃で一晩振盪し、そのうち 3 mL を TB 培地（30 µg/mL Km）20 mL に入れ、37℃で 3 時間培養した。この培養液のうち 10 mL を TB 培地（30 µg/mL Km）480 mL に入れ培養した。O.D.600 が 0.6 前後の時点で 1 M IPTG を 1 mL 加え、18℃、125 rpm/min で、16 時間振盪させた。4,000 rpm, 4℃、15 分間遠心して集菌し、上清を取り除き、沈澱を 10 mL の Sonication Buffer〔20 mM MOPS / Tris（pH7.5～8.0）、0.3 mM スクロース、1 mM PMSF〕10 mL で懸濁、vortex し、8,000 rpm、4℃、10 分間遠心し、上清を捨てる。沈澱に Sonication Buffer 30 mL、(+10 µg/mL Leupeptin と 10 µg/mL pepstatin A) を加え、Sonication（enery 25%、8 分、30 秒間隔で 7 回）する。7,000 rpm、4℃、10 分間遠心し、その上清を 40,000 rpm、4℃、1 時間 5 分遠心する。上清を除き、全量 8 mL になるように BufferA〔70 mM Tris/Cl（pH8.0）、100 mM NaCl、10 mM KCl、15% Glycerol（＋10 µg/mL Leupeptin、10 µg/mL pepstatin A、50 µM PMSF)〕を加えて懸濁し、ホモジナイズした後、Bradford 法によりタンパク量を測定して 10 mg/mL Protein となるように BufferA で希釈し、終濃度 1.5% になるように Foscholine を加える。氷上で 30 分間インキュベートし、90,000rpm、4℃、30 分間遠心した後、その上清が pH7.4～7.6 になるように 1M Tris で調整し、上清と等量の BufferA で希釈し、終濃度が 0.1%になるように Foscholine を加える。氷上で 5 分間インキュベートし、そのタンパク質溶液に Ni-NTA superflow（QIAGEN）2 mL を充填した Econo-Column Chromatography Column（Bio-Rad）に 3 回以上通し、4℃で 1 時間、回転吸着させた。Ni-NTA resin を Wash1Buffer〔70 mM Tris/Cl（pH8.0）、100 mM NaCl、10 mM KCl、20% Glycerol、0.1% Foscholine（+10 µg/mL Leupeptin、10 µg/mL pepstatin A、50 µM PMSF)〕15 mL で洗浄し、Wash2Buffer〔70 mM Tris/Cl（pH8.0）、100 mM NaCl、10 mM KCl、20% Glycerol、1% Octyl glucoside（+10 µg/mL Leupeptin、10 µg/mL pepstatin A、50 µM PMSF)〕15 mL で再度洗浄した。Elution Buffer〔20 mM Tris/Cl（pH7.5）、100 mM NaCl、10 mM KCl、20% Glycerol、250 mM Imidazol、1% Octyl glucoside（+10 µg/mL Leupeptin、10 µg/mL pepstatin A、50 µM PMSF)〕によりタンパク質を溶出した。

3. リポソームへの再構成（凍結、融解、希釈法）

精製した PfCRT 10 µg をリポソームに 500 µg 混合し、-80℃で 15 分静置した。

凍結後これを取り出し、迅速に解凍し、その後直ちに 20 mM MOPS-Tris pH 7.0、150 mM sodium acetate、5 mM magnesium acetate、0.5 mM DTT、1 µg/ml pepstatin A、1 µg/ml leupeptin で 60 倍に希釈し、200,000 × g で遠心しペレットを 200 µL の同じ溶液で懸濁した。

4. PfCRT のみのリポソームへの再構成（凍結、融解、希釈法）

精製した PfCRT 10 µg をリポソームに 500 µg 混合し、-80℃で 15 分静置した。

凍結後これを取り出し、迅速に解凍し、その後直ちに 20 mM tricine-KOH（pH 8.0）、5 mM magnesium chloride、100 mM NaCl で 60 倍に希釈し、200,000 × g で遠心しペレットを 200 µL の同じ溶液で懸濁した。

5. RI 標識した基質の輸送活性測定

試験管内に 20 mM tricine-KOH（pH 8.0）、5 mM magnesium chloride、100 mM NaCl もしくは 20 mM MES-KOH（pH 6.0）、5 mM magnesium chloride、100 mM KCl の溶液に作製したプロテオリポソーム 0.5 µg を加え、2 µM valinomycin 添加後、100 µM [1-^{14}C] tetraethyl ammonium bromide（TEA）(0.5 MBq/µmol)、1 µM [Ring-^{3}H] chloroquine (0.5 MBq/µmol)、100 µM [4,5-^{3}H] lysine (0.5 MBq/µmol)、10 µM [ring-2,5-^{3}H] histidine (0.5 MBq/µmol) のいずれかをいれ、27℃水浴において 3 分間インキュベートした。ここに反応を開始した。

各時間に 130 µL ずつサンプル液を取り、Sephadex G-50 fine に通した。760 × g で 2 分間遠心し、その溶出液をクリアゾル 3 mL に溶かし、液体シンチレーションカウンターにより計測した。なお、測定後の数値は標準偏差をとり、

活性変化のあるものについては、t 検定により、有意差の検定を行った。

結　果

1. D137 残基が PfCRT の輸送に重要な役割を示す

PfCRT において様々な変異体を作製し、その輸送活性を測定した。変異体の作製箇所は粘菌類や、原虫類の PfCRT のアミノ酸配列を比較し、特に電荷のあるアミノ酸残機を中心にアラニンへ変異を導入した。変異を導入した箇所は E95A、H97A、D137A、D329A、D377A である。変異導入したプラスミドを大腸菌を用いて大量発現し、可溶化、精製した。CBB 等を用いて精製度がほぼ同等であることを確認した上で、RI 標識した TEA、Lysine、Histidine を用いて輸送活性を測定した。これらの基質は前回、PfCRT の基質として同定されたものである。この結果から、D137 のみが野生株である 3D7 より有意に低下していたことがわかった（$p < 0.05$、Student t test）（図 1）。D137 は全ての粘菌類と原虫類で保存されたアミノ酸残基で有る。このことからも、非常に重要な役割を担っているのではないか。と考え、D137 についてさらに詳細に機能を調べることにした。

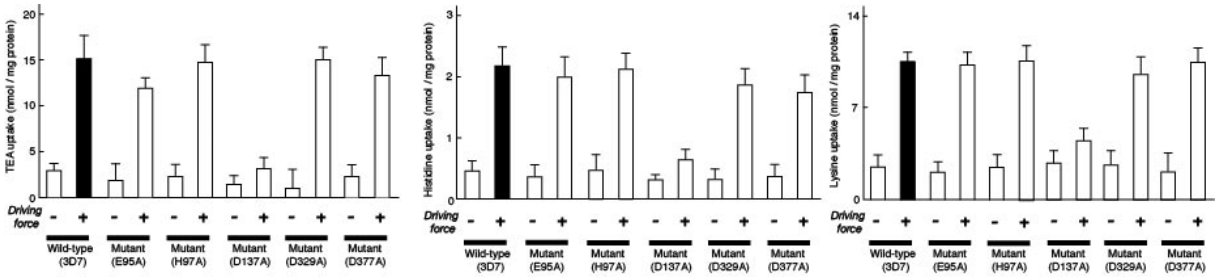


図 1 各種基質による変異体の輸送活性

2. D137 残基の速度論的解析

D137 を詳細に解析する上で、まず、クロロキンに関してその輸送を測定した。クロロキンは、抗マラリア薬の代表的な薬剤で、前回の論文で野生株でも高親和性で輸送が確認されている。クロロキンでも D137 は輸送が低下していた（図 2）。さらに、有意差は取れないが Driving force を加えるかどうかで微妙な活性の上昇があったことから、これが何に起因するのかを駆動力を変えて測定したところ、膜電位が消失すると輸送の上昇は全くなくなった。さらに、TEA の濃度依存的な輸送変化を測定したところ、PfCRT は野生株に比べて常に輸送が低下していた。

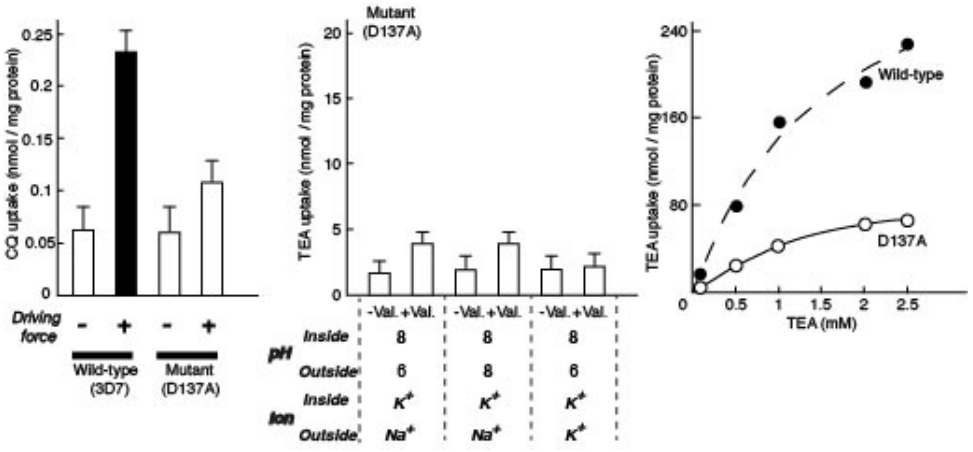


図 2　D137 残基の詳細な輸送解析

3. D137 残基の様々な変異体を用いた解析

D137 残基が基質に依存しなかったことから、D137 をアラニンのみならず、様々な残基に変異をしてその輸送解析を行った。変異体としては、同じチャージを持つグルタミン酸、中性のアスパラギン、ヒスチジンで有る。これらの変異体を測定した結果、グルタミン酸ではアスパラギン酸と同等の活性を有し、ヒスチジンでも若干の活性を有していた。ところが、アスパラギンではその輸送活性は完全に低下していた（図 3）。また、それぞれの変異体に対し、異なる pH での輸送変化を測定したところ、野生株とグルタミン酸は同じような pH プロファイルを示したのに対し、ヒスチジンに関しては、プラトーな活性を、アスパラギンは全く活性の変化は見られなかった。

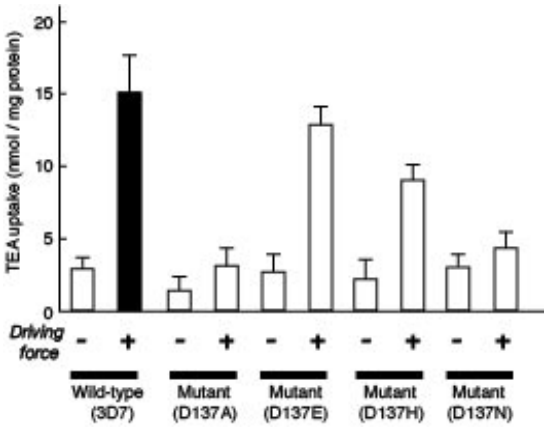


図 3　D137 残基の電荷による活性変化

考　察

以前のPNAS誌での精製PfCRTを用いた結果から、PfCRTは二次性の能動輸送体で、駆動力としてH^+と膜電位の有る状態で、基質を対抗輸送することが明らかとなっていた。今回、変異体を用いた解析により、PfCRTのD137残基は、全ての基質で輸送活性が低下し、その活性変化はたとえpH勾配があったとしても膜電位がなければ全く活性が見られなかったことから、プロトンの供与体として機能している可能性があった。そこで、さらに詳細にD137の役割を調べるために、様々なアミノ酸残基に変異をして、その効果を調べて見た。その結果、グルタミン酸や、ヒスチジンの変異体において、それぞれのpHに対するプロファイルは異なっていたものの、輸送活性はあった。ヒスチジンやアスパラギン酸、グルタミン酸はそれぞれプロトンの供与体としてトランスポーター内で機能することができることから、D137がプロトンのキャリアーとして機能していることが明らかとなった。

D137以外のアミノ酸残基については、基質により若干の輸送活性の変化はあったが、有意差が出るほどの活性の差はなかった。PfCRTは他の薬物排出のトランスポーターと同様、トランスポーター内にいくつも基質結合部位があり、それらが連動して数多くの基質を輸送している可能性がある。実際、以前の論文で、耐性株はPfCRT内のいくつかのアミノ酸残基が変異をしていたわけだが、この変異により、基質の速度論的変化が起こっていることを見出している。今回はプロトンの供与体を発見することができたが、構造–活性相関がもう少し詳細に検討することができることで、D137とその近傍のアミノ酸残基の関連や、基質結合による構造変化等、より詳細な薬剤結合部位を明らかにできることを期待している。

共同研究者・謝辞

本研究を執り行う上で、岡山大学薬学部生体膜機能生化学の表准教授および木下朋美さん、岩井遥さんに感謝する。

文　献

1）　Juge N, Moriyama S, Miyaji T, Kawakami M, Iwai H, Fukui T, Nelson N, Omote H,Moriyama Y. Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter is a H+-coupled polyspecific nutrient and drug exporter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112, 3356-61 (2015). DOI: 10.1073/pnas.1417102112.