

原著論文

## 新規抗マラリア薬候補化合物, 1, 2, 6, 7 – tetraoxaspiro

### [7. 11] nonadecane (N-89) の作用機序に関する研究

坂本沙祐里<sup>1), 2)</sup>, 森田将之<sup>4)</sup>, 平本一幸<sup>3)</sup>, 金恵淑<sup>4)</sup>, 綿矢有佑<sup>4)</sup>, \*平岡修<sup>1), 3)</sup>

<sup>1)</sup> 就実大学大学院医療薬学研究科, <sup>2)</sup> 岡山学院大学人間生活学部,

<sup>3)</sup> 就実大学薬学部薬学科, <sup>4)</sup> 岡山大学大学院医歯薬総合研究科

### Study on the mechanism of action of novel antimalarial drug candidate, 1, 2, 6, 7 – tetraoxaspiro [7. 11] nonadecane (N-89).

Sayuri Sakamoto<sup>1), 2)</sup>, Masayuki Morita<sup>4)</sup>, Kazuyuki Hiramoto<sup>3)</sup>, Hye-Sook Kim<sup>4)</sup>,

Yusuke Wataya<sup>4)</sup>, \*Osamu Hiraoka<sup>1), 3)</sup> \* corresponding author.

<sup>1)</sup>Graduate School of Clinical Pharmacy, Shujitsu University, <sup>2)</sup>Faculty of Human Life Sciences, Okayama Gakuin University, <sup>3)</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Shujitsu University, <sup>4)</sup>Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

(Received 3 October 2023; accepted 6 November 2023)

---

**Abstract** Malaria, the world's most common parasitic infectious disease, is caused by protozoa of the *Plasmodium* genus. Currently, in infected areas, malaria parasites resistant to existing drugs such as chloroquine and artemisinin have emerged, and there is an urgent need to develop new antimalarial drugs with new mechanisms of action. We previously reported the in vitro and in vivo antimalarial potencies of 1, 2, 6, 7 – tetraoxaspiro [7. 11] nonadecane (N-89) bearing endoperoxide structure such as a current first-line antimalarial agent, artemisinin, and also, was identified the endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein, PfERC from *Plasmodium falciparum* as a cellular target protein of N-89. Furthermore, we have already reported that the specific interaction between N-89 and PfERC was confirmed by surface plasmon resonance (Biacore<sup>TM</sup>). In this study, we conducted research to elucidate the mechanism of action of N-89. Our findings suggest that the relationship between iron ions and PfERC, as well as the interaction between the gliding motility protein PfGAP45 (*Plasmodium falciparum* glideosome-associated protein 45) and PfERC, play significant roles in the antimalarial activity of N-89.

**Keywords** : Antimalarial agent, N-89, PfERC, Iron ion, PfGAP45

---

## 【緒言】

マラリアは *Plasmodium* 属の原虫が媒介し、熱帯地域を中心に流行している世界最大の原虫感染症であり、人類にとって大変な脅威となっている。2022 年 12 月の WHO's World malaria report<sup>1)</sup>によると、2021 年には 2 億 4700 万人以上の人々が感染し 62 万人が死に至っている。現在、マラリア感染症に対して WHO が推奨している治療薬として、アルテミシニン (Fig. 1, b) を基本とした多剤併用療法が第一選択となっている<sup>2)</sup>。アルテミシニンは、1979 年に中国古来の青蒿 (*Artemisia annua*) から単離された環状過酸化構造 (エンドペルオキシド構造) を有するユニークな構造をもち、従来からの既存薬 (クロロキン、メフロキン: quinoline 骨格) に対する耐性株に有効であり、現時点でのマラリア治療における最後の砦と言われている<sup>3), 4)</sup>。

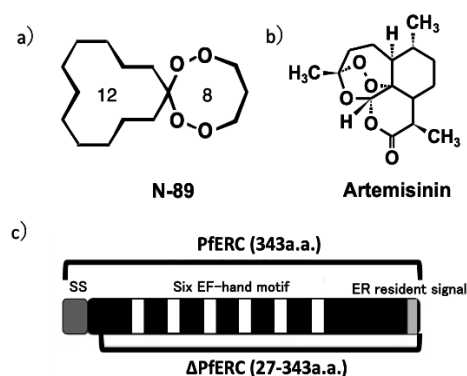


Fig. 1 N-89, Artemisinin, 及び PfERC の構造

しかしながら、近年、アルテミシニンの耐性株の出現が報告され、一刻も早い新薬の開発が急務となっている。そこで我々は、その環状過酸化構造に着目し、その構造を有する約 500 種類の化合物を合成し、抗マラリア活性をスクリーニングしたところ<sup>5)</sup>、*in vitro* で哺乳動物細胞と比較して 328 倍の選択毒性を示し、また *in vivo* においても数 mg/kg で感染サルに単回投与で再燃性を示さない優れた

抗マラリア活性を示す 1,2,6,7 - tetraoxaspiro [7.11] - nonadecane (N-89) (Fig. 1, a) を見出すことに成功した<sup>5), 6)</sup>。

さらに、その作用機序を解明する目的で、N-89 を固定化したカラムを用いて、マラリア細胞抽出液中の N-89 標的タンパク質である PfERC (*Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium-binding protein: マラリア小胞体局在性カルシウム結合タンパク質) を同定し、Biacore™ T200 による表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術を用いた分子間相互作用の解析により、 $\text{Ca}^{2+}$  存在下において N-89 と PfERC の特異的な相互作用を報告した<sup>7)</sup>。PfERC は、 $\text{Ca}^{2+}$  が結合する 6 つの EF-hand モチーフと、N 末端に小胞体分泌シグナル及び C 末端に小胞体局在化シグナルを有する 343 アミノ酸からなるタンパク質であり<sup>8)</sup> (Fig. 1, c)、CREC (Cab45, Reticulocalbin, ERC-55, Calumenin) タンパク質ファミリーに属することが知られている<sup>9)</sup>。CREC ファミリーの細胞内での機能については未だ不明な点が多いが<sup>10)</sup>、PfERC と同様に 2~8 個の EF-hand モチーフと C 末端に小胞体局在化シグナルを有すること、そして小胞体内での  $\text{Ca}^{2+}$  制御への関与及び細胞の生存に必須であることが報告されている<sup>9)</sup>。これらの知見は、PfERC の機能が CREC ファミリー様であり、そして細胞の生育に必須であると推測され、PfERC が、抗マラリア薬探索における新規標的になると考えられる。

実際に、マラリア原虫に N-89 を投与すると、PfERC が減少し、さらに、PfERC を高発現させた遺伝子組換え原虫に対しては、N-89 の感受性が低下することが確認された<sup>7)</sup>。また、N-89 は既存のクロロキンやメフロキン耐性株にも有効性を示すことから、PfERC が抗マラリア薬探索のための新しい独創的な標的になるこ

とが期待される。したがって、そのPfERCを阻害するN-89を実際の臨床現場において実用的な新規抗マラリア薬として開発を進めていくためには、N-89の抗マラリア活性における作用機序を解明することが急務であると考えられる。今回、N-89のPfERCに対する種々の *in vitro* 実験から、鉄イオンと細胞内モータータンパク質が関与するN-89の作用機序の解明に繋がるような知見が得られたので報告する。

## 【方 法】

主な実験操作を以下に示す。

・ 大腸菌を用いたPfERC及びPfGAP45の高発現  
参考文献<sup>11)</sup>と同様の方法により調製した。

・ 電子スピン共鳴法 (ESR) を用いたN-89存在下におけるラジカル産生の解析

4 mM N-89, 50 mM DBNBS (3,5-Dibromo-4-nitrosobenzene sulfonic acid sodium salt), 5 mM FeSO<sub>4</sub>を20 mM PIPES (Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)) buffer, pH 6.0で混合し、37℃, 30分間, Ar gas 置換した無酸素条件下で放置した後に、ESRを測定した。

・ N-89のPfERCに対する特異的分解活性の検出

50 μMのN-89またはアルテミシニン, 4 μgのPfERCまたは6 μgのマルトース結合タンパク質 (MBP) を1 mM Ca<sup>2+</sup>存在下, 20 mM PIPES buffer, pH 6.0の Ar gas置換した水溶液中で混合し, 37 °C, 5分間放置後, 5 mM Fe<sup>2+</sup>を添加してさらに37 °C, 5分間放置後に還元下または非還元下でポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) を行なった。

・ N-89によるFe<sup>3+</sup>産生の検出

Fe<sup>3+</sup>に対して特異的に錯体を形成するメシル酸デフェロキサミン (DFO) を Ar gas 置換した環境下で反応させて、生じた錯体に起因する430 nmの吸光度の変化を測定して確認し

た。5 mM Fe<sup>2+</sup>に50 μMのN-89またはアルテミシニンを添加したのち, 5 mM DFOを添加した直後から経時的に430 nmの吸光度を測定した。

・ 種々の金属イオンのPfERCに対する影響

1 μgのPfERCに1 mMの種々の金属イオンを20 mM PIPES buffer, pH 6.0の Ar gas 置換した水溶液中で混合し, 37℃, 30分間放置後, 15000rpmで遠心した後の上清を非還元下でPAGEを行った。一方, Aggregates のSYPRO Orange染色は, 上記試料に1 μg/mLの濃度で色素を共存させ, 15000rpmで遠心した後に写真撮影を行った。

なお, 各データは複数回の実施により再現性を確認した。

## 【結 果】

アルテミシニンは Fe<sup>2+</sup>の存在下で有機溶媒中においてフリーラジカルを産生するという報告がある<sup>12)</sup>。Fig. 2 は, 同じ環状過酸化構造を有する N-89 が水溶液中においてフリーラジカルを産生する能力があるかどうかを電子スピン共鳴法 (ESR) により調べた結果である。N-89 を生理的環境に近い条件にて ESR 測定を行ったところ, Fig. 2, a) に示すように複数本のシグナルが検出されたので, これらシグナルの超微細構造を解析した。スピントラップ剤として DBNBS を用いた。DBNBS 由来のスピンアダクトは不対電子のある酸素原子の α 位に窒素があるため, DBNBS を用いた ESR 測定では必ず吸収スペクトルは 3 本以上に分裂する。Fig. 2, a) の破線で示した 3 本のシグナルは各ピークの距離が等間隔であるため, 1 つのラジカル由来であると考えることができる。本データは, シグナルが 3 本であることから不対電子に影響する核スピンは窒素以外に存在せず, 破線で示した 3 本のシグナルは, Fig. 2, b) に示すアルコキシルラジカル (A),

第二級 (C) または第三級 (B) 炭素ラジカルから形成されたスピニアダクト由来であることを示している. Fig. 2, a) の実線で示した 6 本のシグナルは各ピークの距離が等間隔であるため, 一つのラジカル由来であると考えることができる. シグナルが 6 本であることから, 窒素核の影響で分裂した 3 本のシグナルにさらに水素核が影響を与え, 各シグナルがそれぞれ 2 本に分裂し, 6 本になったと考えられる. 以上のことは, 実線で示した 6 本のシグナルは, 第二級炭素ラジカル (C) から形成されたスピニアダクト由来であることを示している. 以上より, N-89 は  $\text{Fe}^{2+}$  の存在下でラジカルを産生することが示された.

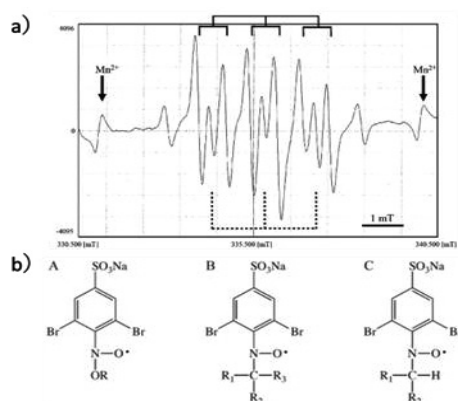


Fig. 2 電子スピン共鳴法 (ESR) を用いたラジカル産生の検出

4mM N-89, 50mM DBNBS, 5mM  $\text{Fe}^{2+}$ , 20mM PIPES buffer, pH 6.0 in Ar gas  
→37°C, 30min  
→ESR測定

次に, N-89処理によるPfERCに及ぼす影響について SDS-PAGE により解析を行なった (Fig. 3) .

PfERC に対して 50  $\mu\text{M}$  の N-89 を単独で処理 (Lane2) したところ, 未処理 (Lane1) と比較して変化は観察されなかった. その状態に 5 mM の  $\text{Fe}^{2+}$  を添加したところ, 低分子側にラダー状にバンドが確認され, PfERC の切断が確認された (Lane3) . 同様の処理を MBP に対して行なったところ, 切断効率は低く, この切断活性は PfERC 特異的であると考えられる (Lane7) .

因みに, 同じ環状過酸化構造を有するアルテミシニンについても同様の実験を行なったところ, PfERC と同程度の切断が確認された (Lane4, Lane8) . 以上の結果は, 環状過酸化化合物が  $\text{Fe}^{2+}$  の存在下において特異的に PfERC を切断することを示している.

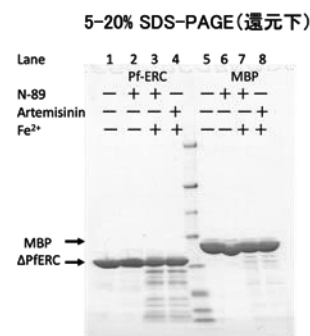


Fig. 3 PfERC に対する過酸化化合物による特異的切断

N-89 or Artemisinin (50 $\mu\text{M}$ ),  $\Delta\text{Pf-ERC}$  4 $\mu\text{g}$  (4.6 $\mu\text{M}$ ) / 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  or MBP 6 $\mu\text{g}$  (5.3 $\mu\text{M}$ )  
→37°C 5min → $\text{Fe}^{2+}$  (5mM) →37°C 5min →SDS-PAGE (還元下)

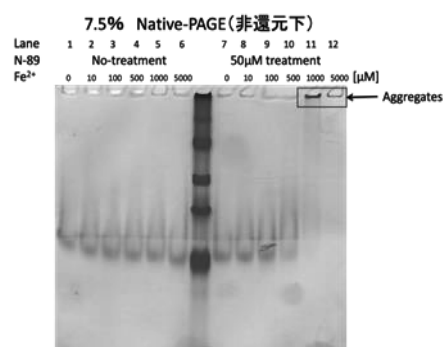


Fig. 4 N-89 及び  $\text{Fe}^{2+}$  の共存下における PfERC に対する影響

1 $\mu\text{g}$   $\Delta\text{PfERC}$  / 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0~5mM  $\text{Fe}^{2+}$  ± 50 $\mu\text{M}$  N-89, 20mM PIPES, pH6.0 in Ar gas  
→5-20% Native-PAGE

次に, N-89 及び  $\text{Fe}^{2+}$  共存下における PfERC への影響について非還元下で Native-PAGE を行なった結果を Fig. 4 に示す. Lane11 及び Lane12 において 1mM 以上の  $\text{Fe}^{2+}$  と 50  $\mu\text{M}$  N-89 共存下において PfERC 単量体のバンドが消失して高度な Aggregates の存在が確認された. さらに, この結果において同条件下では,  $\text{Fe}^{2+}$  が過酸化構造により酸化されて  $\text{Fe}^{3+}$  が発生することが予測されるため, Aggregates 形成に  $\text{Fe}^{3+}$  が関与するかどうかを検討した. 先ずは,  $\text{Fe}^{3+}$  特異的キレーターであるメシル酸デフェロキサミ

ン (DFO) を用いて同条件下における $\text{Fe}^{3+}$ の産生の有無を確認した (Fig. 5) .  $50 \mu\text{M}$  N-89と  $5 \text{ mM}$   $\text{Fe}^{2+}$ を混合し,  $25^\circ\text{C}$ でincubateし, 産生した $\text{Fe}^{3+}$ に  $5 \text{ mM}$ のDFOを添加して錯体を形成させたのち  $430 \text{ nm}$ の吸光度を測定したところ, 非添加と比較して経時的に大きく吸光度の上昇が確認された. 因みに, ここにPferCを共存させても $\text{Fe}^{3+}$ 産生量に影響を及ぼさないことを確認している (data not shown) . このときアルテミシニン添加においても $\text{Fe}^{3+}$ 産生は確認されたが, その産生能力は, N-89の方が4倍以上大きい結果となった. この効果は, 金属キレーターであるEDTAを前投与した場合は, N-89による $\text{Fe}^{3+}$ の産生は大きく抑えられることがわかった. 以上の結果より, 環状過酸化構造により $\text{Fe}^{2+}$ が酸化されて $\text{Fe}^{3+}$ が形成された. その

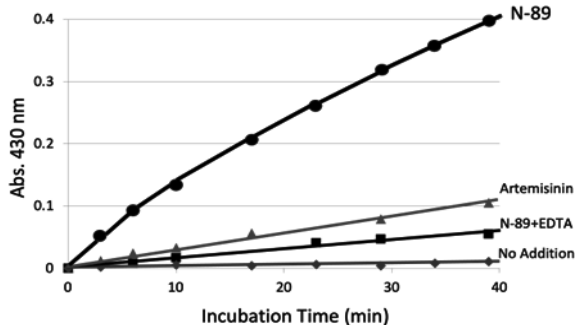


Fig. 5 N-89による $\text{Fe}^{3+}$ の産生

$5 \text{ mM}$   $\text{Fe}^{2+}$  ±  $50 \mu\text{M}$  N-89 or Artemisinin ±  $5 \text{ mM}$  EDTA in Ar gas  
→ 経時的に  $5 \text{ mM}$  DFO を添加後して  $430 \text{ nm}$  Absorbance 測定

酸化力は, N-89の方がアルテミシニンよりも4倍以上大きいことがわかった.

次に, 環状過酸化構造に起因して産生された $\text{Fe}^{3+}$ がPferCのAggregates 形成に及ぼす影響を非還元下のSDS-PAGE解析により調べた (Fig. 6) . PfERCに  $1 \text{ mM}$ の $\text{Fe}^{2+}$ を単独処理した場合は, 大きな変化は観察されなかったが,  $1 \text{ mM}$  の $\text{Fe}^{3+}$ を単独処理した場合は, PfERC単量体のバンドの消失が観察され, 同時にAggregatesの形成が確認された. したがっ

て, $\text{Fe}^{3+}$ の存在により, PfERCのAggregates形成が誘導されるが, この誘導はEDTAやDFOの添加により解消されることがわかった (Fig. 7) . 以上のことは, MBPに対しては観察されなかったことから, $\text{Fe}^{3+}$ がPferCに対して特異的にAggregatesの形成を起こすと考えられる. 因

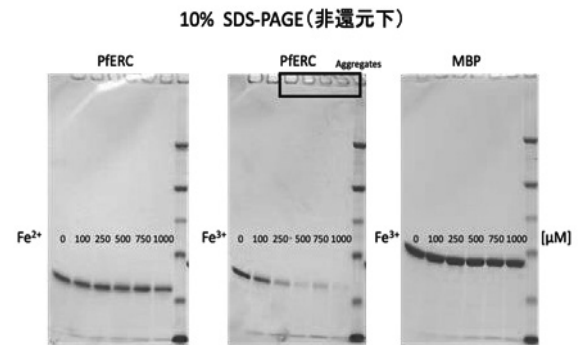


Fig. 6  $\text{Fe}^{3+}$ のPferCに対する影響

$1 \mu\text{g}$   $\Delta\text{Pf-ERC}/1 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  or  $3 \mu\text{g}$  MBP/ $1 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  in  $20 \text{ mM}$  PIPES, pH6.0  
→  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Fe}^{3+}$  (final 0 -  $1000 \mu\text{M}$ ) →  $37^\circ\text{C}$  30min in Ar gas  
→ SDS-PAGE (非還元下)

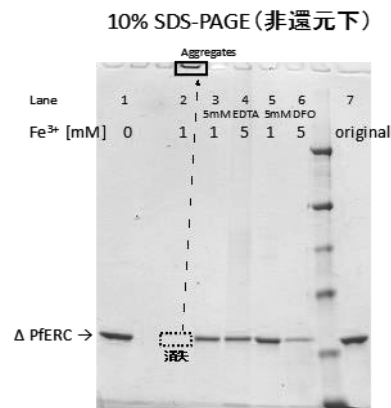


Fig. 7  $\text{Fe}^{3+}$ によるPferCのAggregates 形成に対する金属キレーターの影響

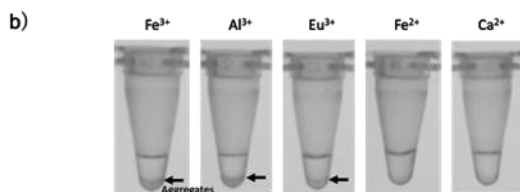
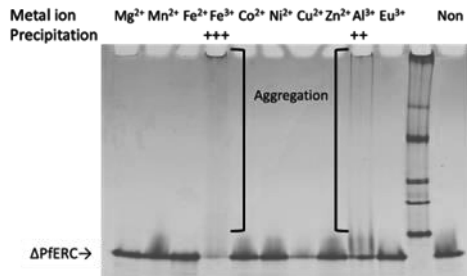
$1 \mu\text{g}$   $\Delta\text{Pf-ERC}/1 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  (final 1 or  $5 \text{ mM}$ ),  $20 \text{ mM}$  PIPES, pH6.0 in Ar gas →  $37^\circ\text{C}$  30min →  $5 \text{ mM}$  EDTA or DFO → SDS-PAGE (非還元下)

みに, このAggregatesの形成は, SDS還元下において解消されることもわかった (Fig. 3) .

次に, このAggregates形成が $\text{Fe}^{3+}$ 特異的かどうかを調べるために, 各種金属イオンによるPferCのAggregates形成に及ぼす影響を非還元下のNative-PAGEを行なって調べた (Fig. 8, a) . この結果より, Aggregates形成力が最も大きかったものは $\text{Fe}^{3+}$ で, 次いで $\text{Al}^{3+}$ であった. この電気泳動では鮮明に観察でき

なかったが、疎水的環境 (Aggregates) に結合して蛍光を発するSYPRO Orangeで染色したところEu<sup>3+</sup>も僅かにAggregatesの形成が観察

a) 5-20% Native-PAGE (非還元下)

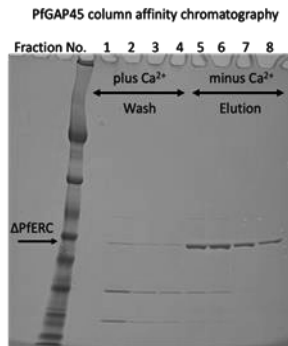


Aggregates 形成能 3価金属イオン >> 2価金属イオン

Fig. 8 各種金属イオンのPFERCに対する影響

1 μg ΔPFERC (Ca<sup>2+</sup>未添加), Metal ion (1mM), 20mM PIPES, pH6.0 in Ar gas  
→37℃ 30 min →1 μg/mL SYPRO Orange 染色 →写真: (b)  
→5-20% Native-PAGE (非還元下): (a)

a) 5-20% SDS-PAGE (還元下)



b) Western blot analysis

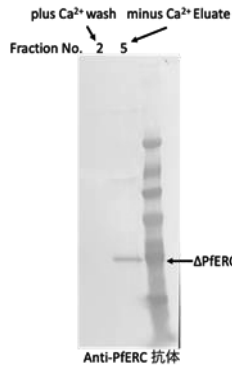


Fig. 9 PfGEAP45とPFERCの相互作用

MBP-PfGEAP45 固定化カラム→ΔPFERC apply→1mM Ca<sup>2+</sup> Wash→Minus Ca<sup>2+</sup> Elution  
→SDS-PAGE(還元下): a) & Western blot analysis: b)

されたことから (Fig. 8, b), 主に3価の金属イオンがPFERCのAggregates形成に寄与する結果となった。

Fig. 9は, MBP-PfGEAP45融合タンパク質をアミロースレジンに固定化したのち, 完全精製した ΔPFERCを添加して, アフィニティークロマトグラフィーを行った結果である. 因みに, ここで使用したPfGEAP45は, Morita, et al.

の実験によりN-89固定化カラムに結合することが示されている gliding motility protein (モータータンパク質の1種) である<sup>14)</sup>. 1 mM Ca<sup>2+</sup>を含むpH8の緩衝液でWashしたのち, Ca<sup>2+</sup>を含まない緩衝液で結合物を溶出させた. Fig. 9 a)は, 溶出液をSDS-PAGE解析した結果で, ΔPFERCは, Ca<sup>2+</sup>存在下でPfGEAP45に結合し, Ca<sup>2+</sup>非存在下で溶出されることがわかった. Fig. 9 b)は, 抗PFERC抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果であるが, Ca<sup>2+</sup>非存在下で溶出されたタンパク質は ΔPFERCであることが確認された。

【考 察】

Fe<sup>2+</sup>の存在下においてN-89及びアルテミシニンがPFERCを特異的に切断することが確認された. N-89 (Fig. 1: 水溶液中) もアルテミシニン (有機溶媒中)<sup>12)</sup>もどちらもフリーラジカルの発生が確認されていることから, どちらもタンパク質に対してフリーラジカルを介した切断活性を有することは妥当な結果である (Fig. 2). しかしながら, 今回のデータは, MBPよりはPFERCに対する切断効率は高かったが, N-89とアルテミシニンの間で切断効率に差はなかった。

Biacore™ T200を用いた分子間相互作用の実験では, アルテミシニンとは異なりN-89が特異的にPFERCと相互作用<sup>11)</sup>すること, さらに, Fe<sup>2+</sup>をFe<sup>3+</sup>に酸化する能力がN-89の方がアルテミシニンよりも4倍以上強い (Fig. 5) ことは, それに比例して発生するフリーラジカル量も多いと想定されるのでN-89による切断効率が必然的に高くなると予想される. 因みに, この酸化力の強さは, ペルオキド架橋の数がアルテミシニンの1個に対してN-89は2個であるので, その数と関連していると考えられる (Fig. 1). しかしながら, N-89とアルテミシニ

ンとの間でPfERCに対する切断効率に差が観察されなかった。この結果の考察としては、まずは、 $\text{Ca}^{2+}$  (2価イオン) と結合したPfERCがフリーラジカルに対する感受性が高く、MBPよりはPfERCの方が効率よく切断された可能性が考えられる。次に、本実験条件下では、PfERC及びアルテミシニンのどちらの場合においてもPfERCは完全に分解されなかった (Fig. 2)。このことは、今回の実験環境下では、生じたフリーラジカルの寿命が極めて短く、N-89とアルテミシニンの間の切断効率の差が反映されなかったと考えられる。今後、N-89に起因するフリーラジカル本体を特定したのち、反応条件を再検討してN-89とアルテミシニンとの間の切断効率の差を見出していく必要がある。

次に、今回、N-89の酸化作用に起因して $\text{Fe}^{2+}$ から $\text{Fe}^{3+}$ が産生され、その結果、PfERC特異的にAggregatesを形成することがわかった (Fig. 4, 6, 7, 8)。カルパインは、5個のEF-handを持ち、C末端のEF-handどうしが $\text{Ca}^{2+}$ を介して一対になって二量体を形成するが<sup>13)</sup>、PfERCも6個のEF-handモチーフを有するので<sup>8)</sup>、今回の3価金属イオンによるPfERCの凝集は、分子内にEF-handモチーフが複数存在することに起因して、3価の金属イオンを介して複数のPfERCの分子間が連結されて高度なAggregates形成に至った可能性が考えられる。上記仮説は、実際にAggregates形成が還元剤処理により解消されることにより支持されると考えられる (Fig. 3)。因みに、カルパインは $\text{Mg}^{2+}$ を介して二量体化した場合は、他のEF-handモチーフへの $\text{Ca}^{2+}$ の結合能が上がるということが知られている<sup>13)</sup>。PfERCにおいても $\text{Mg}^{2+}$ を添加した際に会合や凝集は観察されなかったが (Fig. 8 a)、熱に対する安定性が変化したの

で、PfERCと他の金属イオンとの関連を解析することは有意義であると思われる (data not shown)。

今回のデータは主として $\text{Fe}^{2+}$ が関与した知見であるが、マラリア細胞内において、 $\text{Fe}^{2+}$ が最も豊富に存在する細胞内部位は、ヘモグロビンを分解して栄養源を供給する場であるTrophozoite体 (赤血球内栄養体) 内のFood vacuole (食胞) である。実際に、アルテミシニン、クロロキン、ルメファントリン、及びキニーネは、ヘモグロビン分解に関与するヘモグロビナーゼ複合体に結合して、有毒なヘムから無毒なヘモゾイン (ヘム重合体) 形成を阻害することによってマラリア原虫の血液ステージに抑制的な影響を及ぼすことが報告されている<sup>14)</sup>。ヘモグロビナーゼの活性制御は $\text{Ca}^{2+}$ に依存していることから、この段階にPfERCが関与する可能性は十分に考えられる。したがって、N-89がヘモグロビンを分解する過程を何らかの機構を介して阻害する可能性は否定できない。実際に、N-89の抗マラリア活性が主にTrophozoite期で発現することを示した Morita, et al. の報告と一致している<sup>15)</sup>。現時点においてPfERCがヘモグロビン分解に直接的に関与するデータは無いので今後に期待する。

一般的に、アルテミシニンの正確な作用機序は明らかにされていないが、現在までに得られている薬理学的作用の知見は、環状過酸化構造とヘム鉄との作用時に発生するフリーラジカルによる細胞障害とヘモゾイン形成阻害<sup>12)</sup>、カルシウムポンプ (SERCA: sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) が関与した小胞体内カルシウム代謝の調節阻害<sup>3)</sup>、ミトコンドリア膜電位への直接的な影響など多岐にわたることから、その作用機序

は多面的であり複雑な抗マラリア活性を発揮すると考えられている。N-89と特異的な相互作用を示すPfERCについても、細胞内免疫染色実験の結果からシャペロンの1種であるBip (Hsp70)と共存して広く細胞質内に分布していることから<sup>15)</sup>, 必然的にPfERCに対して特異的に相互作用するN-89<sup>11)</sup>の作用機序も多面的な生命現象への関与が示唆される。Manuel A. Fierro et al.の報告によると、マラリア原虫の赤血球細胞からの脱出 (Egress) 経路において複雑なタンパク質分解カスケードが働いており、その際にアスパラギン酸プロテアーゼの1種であるPlasmeypsin X (Plm X) がその経路の調節因子であり、PfERCは、Plm X の下流を調節することが示唆されている<sup>16), 17)</sup>。さ

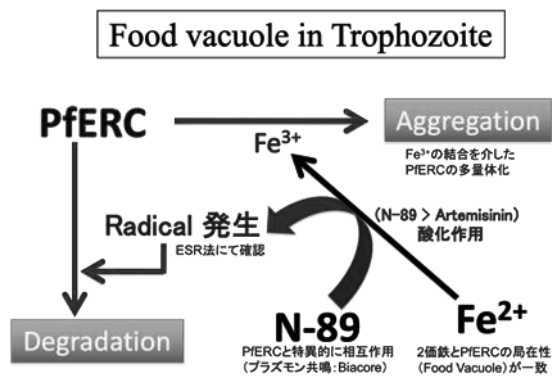


Fig. 10 食胞内におけるN-89の作用機序 (仮説)

らに、このカスケードにはセリンプロテアーゼであるSERA5 (serine repeat antigen 5) も関与しており、この時にCa<sup>2+</sup>によって調節されるリン酸化酵素, CDPK1 (calcium-dependent protein kinase 1) が深く関わっていることから、Ca<sup>2+</sup>を介したPfERCとの関連が想像されることは興味深い<sup>18)</sup>。

一方で、Fe<sup>2+</sup>が豊富に存在する食胞内におけるヘム代謝においても、Plm X の同族であるPlm I<sup>19)</sup>, Plm II<sup>19, 20)</sup>, 及びPlm IV<sup>20)</sup>が関与するヘモグロビナーゼ複合体がCa<sup>2+</sup>の制御下で

ヘモゾイン形成に寄与することが知られている<sup>21)</sup>。以上のことを総合して考えると、食胞内には、Fe<sup>2+</sup>, Plm I, II, IV, 及びPfERCが共存する可能性が考えられ、そこにさらにN-89が共存すると、Fe<sup>3+</sup>及びフリーラジカル形成によりPfERCのAggregatesの形成と限定分解が起こってPfERCが特異的に阻害されることが、N-89が抗マラリア活性を示す1つの要因であると考えられる (Fig. 10)。因みに、今回、実験に使用した鉄イオン濃度は、赤血球内の鉄イオン濃度が数~数十mMであることを考慮すると現実的な濃度である。さらに、食胞内で形成されたヘモゾインは、タンパク質分解カスケードにより赤血球膜が崩壊されると同時にMerozoite体 (赤血球内分裂体, Schizont由来の分裂小体) と共に血中に放出され (Egress経路), 宿主免疫系を攪乱し<sup>22)</sup>, その結果、脱出したMerozoite体は新たな赤血球に再び侵入 (Invasion) して感染が拡大する。この知見に関してPfERCが関与している可能性を後押しするデータとして、Invasion 経路においてMerozoite体表面にGPIアンカーされたMSP1 (merozoite surface protein 1) が赤血球膜上のBand3 protein (酸素/二酸化炭素の輸送に関与) と特異的に結合して赤血球に付着するが、そのMSP1と結合するMSP7 (機能未知) がN-89固定化カラムに結合することが示されていることは興味深い<sup>15)</sup>。さらに、赤血球への付着後にモータータンパク質の働きによりMerozoite体の赤血球へのInvasionが起こるが、我々は、Merozoite体の赤血球からのEgress/Invasion経路で働く細胞質内のPfGAP45 (N-89固定化カラムに結合) とPfERCがCa<sup>2+</sup>存在下で特異的に相互作用することを新たに発見した (Fig. 9)。因みに、この経路



でもCa<sup>2+</sup>で制御されるCDPK1がPfGAP45のリン酸化に関与していることは興味深い<sup>18)</sup>。

以上のことから、PfERCは、Plm X が関与するEgress/Invasion経路のタンパク質分解カスケード及び細胞質内モータータンパク質、PfGAP45をCa<sup>2+</sup>存在下で調節することによって、Merozoite 体 と ヘ モ ゾ イ ン の Egress/Invasionを進行させていると考えられる。そこにN-89が共存すると、PfERC阻害に起因するEgress/Invasion経路の破綻が起こり、結果的に抗マラリア活性の一要因を発揮すると思われる。興味深いことに、N-89によるFe<sup>3+</sup>を介したPfERCの分解と凝集及びEgress/Invasion時のモータータンパク質との特異的相互作用は、マラリアライフサイクルにおいて、PfERC発現のピークがMerozoite 体及びTrophozoite体であることと一致する<sup>15)</sup>。このことは、今回の結果を強く支持すると考えられる。

さらに、PfERC とプロテアソーム関連タンパク質や細胞内情報伝達に関わるタンパク質 (N-89 と結合) との関連性が示唆されている<sup>15)</sup>。それらのことも含めて、ヘモゾイン形成阻害とその後の宿主免疫系抑制阻害、Egress/Invasion 経路の阻害、そして、フリーラジカル由来の多面的な作用など、N-89の作用機序もアルテミシニンと同様に多面的な作用機序を示すと推察される。以上のことから、作用機序の類似性によりアルテミシニン耐性株に対して N-89 が有効でない可能性が考えられるが、しかしながら、PfERC の遺伝子破壊が致死的<sup>15)</sup>であること及びアルテミシニンが PfERC と相互作用しないことを考えるとアルテミシニン耐性株にも N-89 は有効であろう。

最後に、今回の結果は、マラリア原虫がライフサイクルのほとんどを赤血球内で過ごすことを考慮すると、実際の感染ヒト体内においても同様の機序により N-89 が抗マラリア活性を示すと考えられる。

#### 【利益相反】

他者との利益相反はない。

#### 【引用文献】

- 1) <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> 2022 年 9 月 30 日 閲覧
- 2) Davis,TM.,Karunajeewa,HA.,Ilett,KF.: Artemisinin-based combination therapies for uncomplicated malaria. *Med. J. Aust.* 182,181-185. (2005)
- 3) Eckstein Ludwig,U.,Webb,R.J.,Goethem,V.,I.D.East,J.M.Lee,A.G.Kimura,M.,O'Neill,P.M.,Bray,P.G.,Ward,S.A.,Krishna,S.:Artemisins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*,424,957-961. (2003)
- 4) Klayman,D.:L.Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*,228,1049-1055. (1985)
- 5) Kim,HS.,Shibata,Y.,Wataya,Y.,Tsuchiya,K.,Masuyama,A.,Nojima,M.:Synthesis and Antimalarial activity of cyclic peroxides,1,2,4,5,7-pentoxocanes and 1,2,4,5-tetroxanes. *J.Med.Chem.*,42,2604-2609. (1999)
- 6) Sato,A.,Hiramoto,A.,Morita,M.,Matsumoto,M.,Komichi,Y.,Nakase,Y.,Tanigawa,N.,Hirakawa,O.,Hiramoto,K.,Hayatsu,H.,Higaki,K.,Kawai,S.,Masuyama,A.,Nojima,A.,Wataya,Y.,Kim,HS.: Antimalarial activity of endoperoxide compound 6-(1,2,6,7-

- tetraoxaspiro [7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol. *Parasitol. Int.*,60,270-273. (2011)
- 7) Morita,M.,Hitomi,S.,Hiramoto,A.,Sato,A.,Hiraoka,O.,Sakura,T.,Kaneko,O.,Masuyama,A.,Nojima,M.,Wataya,Y.,Kim,HS. : *Plasmodium falciparum* endoplasmic reticulum-resident calcium binding protein is a possible target of synthetic antimalarial endoperoxides,N-89 and N-251. *J. Proteome Res.*,11,5704-5711. (2012)
- 8) Rawlings,D.J.,Kaslow,D.C. : A Novel 40-kDa Membrane-associated EF-hand Calcium-binding Protein in *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*,267,3976-3982. (1992)
- 9) Honore,B. : The rapidly expanding CREC protein family:members,localization,function,and role in disease. *Bioessays*,31,262-277. (2009)
- 10) Sahoo,SK.,Kim,T.,Kang,GB.,Lee,JG.,Eom,SH.,Kim,DH. : Characterization of calumenin-SERCA2 interaction in mouse cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*,284,31109-31121. (2009)
- 11) Hiraoka,O.,Takashima,Y.,Sakamoto,S.,Sugiyama,S.,Morita,M.,Wataya,Y.,Kim,HS. : Functional expression and characterization of EF-hand endoplasmic reticulum-resident calcium-binding Protein,PfERC from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli* for crystallization. 就実薬学雑誌. ,1,42- 50. (2014)
- 12) Meshnick,SR.,Taylor,TE.,Kamchonwon,S. : Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy *Microbiol Rev.*, 60 (2), 301-315. (1996)
- 13) Maki,M.,Takahara,T.,Shibata,H. : カルシウム依存的相互作用因子から探る penta-EF-hand ファミリーの機能 *Seikagaku*,91(2), 191-209. (2019)
- 14) Chugh,M.,Sundararaman,V.,Kumar,S.,Reddy b,V.S.,Siddiquic,WA.,Stuar,KD.,and Malhotra,P. : Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum* *PNAS*,110 (14),5392-5397. (2013)
- 15) Morita,M. : 環状過酸化化合物の抗マラリア作用機序の解析 *Doctoral dissertation.,Okayama University,Okayama,Japan* (2013)
- 16) Low,LM.,Azasi,YV.,Sherling,ES.,Garten,M.,Zimmerberg,J.,Tsuboi,T.,Brzostowski,J.,Mu,J.,Miller,LH. : Deletion of *Plasmodium falciparum* Protein RON3 Affects the Functional Translocation of Exported Proteins and Glucose Uptake *Nature*,, 463,632-636. (2010)
- 17) Fierro,KA.,Asady,B.,Brooks,CF.,Cobb,DW.,Villegas,A.,Moreno,SNJ.,Muralidharan,V. : An Endoplasmic Reticulum CREC Family Protein Regulates the Egress Proteolytic Cascade in Malaria Parasites *mBio*,11 (1),e03078-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03078-19>. (2020)
- 18) Guerra,ED. : Understanding the Surface of Hemozoin and its Synthetic Analogue Hematin Anhydride *Doctoral dissertation., McGill University,Montreal,Canada* (2019)

- 19) Francis, JSE., Banerjee, R., and Goldberg, DE. :  
Biosynthesis and Maturation of the Malaria  
Aspartic Hemoglobins Plasmepsins I and  
II *J. Biol. Chem.*, 272(23), 14961–14968.  
(1997)
- 20) Liu, J., Istvan, and Goldberg, DE. :  
Hemoglobin-degrading Plasmepsin II Is  
Active as a Monomer *J. Biol.*  
*Chem.*, 281, 38682–38688. (2006)
- 21) Nasamu, AS., Polino, AJ., Istvan, ES., and  
Goldberg, DE. : Malaria parasite  
plasmepsins: More than just plain old  
degradative pepsins *J. Biol. Chem.*, 295(25),  
8425–8441. (2020)
- 22) Iyer, GR., Singh, S., Kaur, I., Agarwal, S., Siddiqui  
, MA., Bansal, A., Kumar, G., Saini, E., Paul, G.,  
Mohammed, A., Chitnis, CE., Malhotra, P. :  
Calcium-dependent phosphorylation of  
*Plasmodium falciparum* serine repeat antigen  
5 triggers merozoite egress *J. Biol.*  
*Chem.*, 293 (25), 9736–9746. (2018)