

病原微生物のプロテインキナーゼの機能解析と薬剤標的への可能性

加藤健太郎（東京大学大学院農学生命科学研究科）

akkato@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

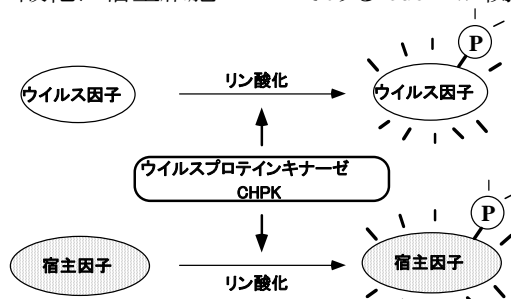
はじめに

近年、BSE、新型インフルエンザウイルス、口蹄疫等に代表される畜産動物の感染症の発生と流行が、国民の食の安全性と安定供給に対する危機感および不安感を招いている。いくつかのウイルス感染症にはワクチンが開発されているものの、原虫感染症には有効なワクチンは皆無と言っても過言ではない。その対策としては、媒介昆虫の駆除、畜舎の消毒などしかないうえに、特異的な防御効果のある薬剤開発も進んでいない。このような現状を打開するため、演者らはヘルペスウイルス及びアピコンプレックス原虫に保存されている酵素、特にプロテインキナーゼ(PK)について、薬剤開発のターゲットとしての視点から機能解析を行ってきた(1,2,14)。

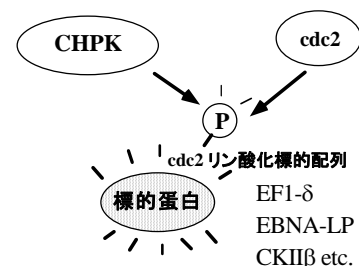
ウイルスゲノムが保持しているプロテインキナーゼ

ヘルペスウイルスに対する薬剤として実用化されているアシクロビルやガンシクロビルはウイルス独自のチミジンキナーゼやPKをその標的としている(1988年ノーベル生理学・医学賞)ことから、原虫PKを標的とした薬剤についても新しい原虫薬のシーズとしての可能性が十分にあると考えられる。

演者は家禽にリンパ腫を引き起こし、癌ウイルスとして世界で初めて有効な生ワクチンが開発されたマレック病ウイルスのゲノムプロジェクトに参加した(16,17)。これをきっかけとして、同じくリンパ腫を引き起こすヘルペスウイルスである Epstein-Barr ウイルス(EBV)に保存されているPKについて、薬剤ターゲットとしての可能性を考え、ヘルペスウイルスに特徴的な潜伏感染機構に関係するPKの機能を解析した。EBVのウイルス特異PKが、ウイルス因子及び、宿主細胞因子をリン酸化することを明らかにするとともに、このリン酸化がヘルペスウイルスの全ての亜科で普遍的に保存されている現象であることを発見した(13,14,15; 図1)。さらに、このリン酸化に宿主細胞のPKであるcdc-2が関わることを明らかとした(13,14; 図2)。



(図1)ウイルスプロテインキナーゼ(CHPK)とウイルス複製の関係

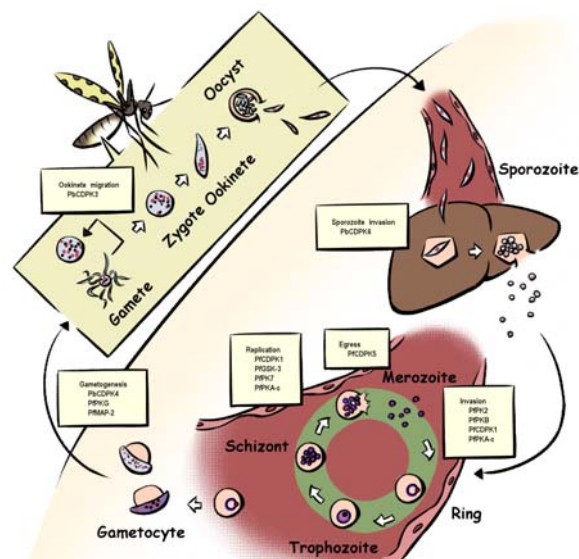


(図2)CHPKによるcdc-2の模倣

原虫のプロテインキナーゼとライフサイクルの制御

これらのウイルス研究で得られた知見を、当時ほとんど解析が進んでいなかった原虫PKの機能解析に応用した。原虫のプロトタイプであるマラリア原虫(2,11,12; 図3)と人獣共通感染症の原因となり、食肉からの感染も多いトキソプラズマ原虫を研究対象とした。

真核細胞における PK の基質リン酸化は、転写、翻訳、蛋白質合成系、細胞周期、アポトーシス等、重要な細胞機能を制御していることが知られている。マラリア原虫のメロゾイドが赤血球に侵入する際、まず Ca^{2+} 濃度が急激に上昇することが知られている。この Ca^{2+} 濃度の上昇と原虫の赤血球侵入機構の解析を目的として、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼに相同性がある *Plasmodium falciparum* protein kinase 2 (PfPK2) について機能解析を行った。その結果、カルモジュリン拮抗薬が PfPK2 のリン酸化活性や赤血球侵入を阻害することを明らかにした。また、PfPK2 はメロゾイドのみに発現し、これは同じくメロゾイドに局在することが知られているカルモジュリンの挙動と類似しており、メロゾイドの赤血球侵入に関わっていることが示唆された (9)。



(図3) マラリア原虫のライフサイクルにおけるPKの役割

また、熱帯熱マラリア原虫のカルシウム依存性プロテインキナーゼである calcium-dependent protein kinase 4 (PfCDPK4) は、*Plasmodium berghei* においてその相同遺伝子がガメトサイトジェネシスにおいて雄性ガメトサイトの鞭毛放出や DNA 合成に必須であることが報告されている。この機能解析の結果から PfCDPK4 のリン酸化活性はカルシウム濃度に依存性があるなど、植物の CDPK のそれと似た生化学的活性を有していた。PfCDPK4 のリン酸化は Ca^{2+} 濃度及び pH の上昇、温度低下によって活性化され、熱帯熱マラリア原虫のガメトサイトジェネシスを促進するカルシウムシグナル伝達系に関わっていることが示唆された (7)。また、作製された PfCDPK4 に対する抗体は、熱帯熱マラリア原虫の雄性ガメトサイトマーカーとして利用できることが明らかとなった (8)。

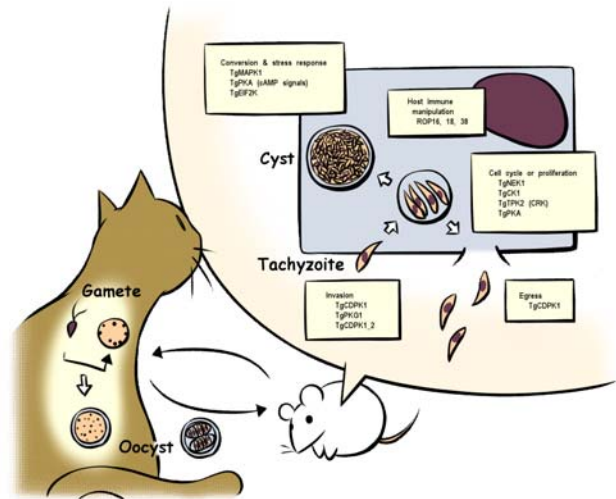
さらに、熱帯熱マラリア原虫の cAMP-dependent protein kinase (PfPKA) の catalytic subunit (PfPKA-C) と哺乳類の PKA-C との阻害薬への感受性について比較したところ、cATP の競合阻害剤である H89 は哺乳類の PKA-C と同様に PfPKA-C のキナーゼ活性についても一定の阻害効果を持っていた。一方で、哺乳類において PKA-C の活性調節のため保存されている阻害蛋白質 PKI は PfPKA-C のキナーゼ活性についてほとんど阻害効果がなかった。このことから、原虫には哺乳類とは別の形で PfPKA-C の働きを制御する分子や機構が存在することが示唆された (10)。

トキソプラズマ原虫のプロテインキナーゼ(2; 図4)

以上の結果をトキソプラズマ原虫の PK 研究に応用し、以下の解析結果を得た (2,4)。PK に対する阻害剤誘導体 1NM-PP1 は主に酵母学分野で研究されてきた。PK のアミノ酸の中で 1NM-PP1 の感受性決定側鎖の分子量が小さいほど、その阻止効果を発揮し、このような PK を ASKA (analog sensitive kinase allele) と呼ぶ。トキソプラズマ原虫の野生株に存在する ASKA をゲノムから予測した結果、TgCDPK1 のみが分子量が最小であるグリシンを 1NM-PP1 の感受性決定側鎖に持つ ASKA であることが予測された。実際、トキソプラズマ原虫の野生株 (親株; RH/ht) は 1NM-PP1 に感受性であるが、最も感受性を持つと予測された CDPK1 の非 ASKA 変異体を発現させた RH/ai-C1 株は、1NM-PP1 に対する耐性を獲得した。TgCDPK1 は侵入の前段階として必要な Ca^{2+} シグナル及び、PK 依存性のマイクロネーム分泌や、滑走運動に関わり、侵入を制御す

ることが報告されていた。1NM-PP1 による TgCDPK1 の阻害では宿主細胞侵入率は 40% へ低下し、滑走運動についても低下したが、マイクロネーム分泌は影響を受けなかった (5,6)。

また、トキソプラズマ原虫の TgPKA の catalytic subunit (TgPKA-c) と regulatory subunit (TgPKA-r) の同定に成功した。原虫内で TgPKA-r を過剰発現されることで原虫の宿主細胞内での増殖が低下することが明らかとなった。トキソプラズマ原虫では PKI に対する相同遺伝子が見つからず、哺乳類の PKI の存在下で原虫の増殖には影響が無かった (3)。



(図4)トキソプラズマ原虫のライフサイクルにおけるPKの役割

さらに、PfPK2 のトキソプラズマ原虫での相同遺伝子を TgCaMKrk と名付け、機能解析を行った。TgCaMKrk は、原虫の宿主細胞侵入の動力装置である glideosome の構成因子である GAP45 と細胞内及び細胞外寄生でともに共局在し、*in vitro* でリン酸化することが明らかとなった。

おわりに

これらの解析結果は、原虫の宿主細胞への侵入・脱出、宿主細胞内での増殖、鞭毛放出等、次のライフステージへの移行・転換時に原虫 PK が鍵となるシグナル伝達を担っていることを示すものである。従って、原虫 PK を特異的に阻害することでそのライフサイクルを効果的に遮断できる可能性が高いと考えられる。さらに、CDPK は宿主であるヒトのゲノムには保存されておらず、病原体が特異的に保持する酵素群は薬剤標的として理想的な分子であり、その意味で演者らが進めている原虫 PK の研究は新たな抗原虫薬の開発という視点からも重要な知見を与えるものと考えられる。

謝辞

日本農学進歩賞の受賞にあたっては、公益社団法人日本獣医学会から推薦を頂きました。日本獣医学会の中山裕之代表理事をはじめ、関係の先生方、及び事務局の皆様に深く感謝申し上げます。本稿で紹介した研究は、主に東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医微生物学研究室で行ったものです。同研究室の関係者の皆様、特にともに研究を行ってきた学生、研究員の皆様には多大なるご協力をいただき、ここに感謝の意を表します。また、東京医科歯科大学、米国国立衛生研究所でともに研究を行ってきた皆様にも併せて感謝申し上げます。

引用文献(*; 責任著者)及び知的財産権

1. **加藤健太郎**、2012 年、「寄生虫学研究：材料と方法」原虫プロテインキナーゼの酵素活性測定系、三恵社、pp. 111-112.
2. **Kato K***, Sugi T, Iwanaga T. (2012) Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage. *Parasitol Int.* 61: 224-234. Malaria Nexus 記事掲載(2012 年 3 月 9 日)
3. Kurokawa H, **Kato K***, Iwanaga T, Sugi T, Sudo A, Kobayashi K, Gong H, Takemae H, Recuenco FC, Horimoto T, Akashi H. (2011) Identification of *Toxoplasma gondii* cAMP dependent protein kinase and

its role in the tachyzoite growth. **PLoS One**. 6:e22492.

4. Sugi T, **Kato K***, Kobayashi K, Watanabe S, Kurokawa H, Gong H, Pandey K, Takemae H, Akashi H. (2010) Use of the kinase inhibitor analog 1NM-PP1 reveals a role for *Toxoplasma gondii* CDPK1 in the invasion step. **Eukaryot Cell**. 9:667-670.
5. **加藤健太郎**、明石博臣、杉達紀 (**以上発明者**) 「原虫プロテインキナーゼの即時的機能抑制が可能なトキソプラズマ原虫株」 特願2009-286975、**加藤健太郎(出願人)** 2009年12月17日
6. Sugi T, **Kato K***, Kobayashi K, Pandey K, Takemae H, Kurokawa H, Tohya Y, Akashi H. Molecular analyses of *Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3. **Parasitol Int**. 58:416-423. (2009)
7. **Kato K***, Sudo A, Kobayashi K, Sugi T, Tohya Y, Akashi H. (2009) Characterization of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 4. **Parasitol Int**. 58:394-400.
8. **加藤健太郎(発明者)** 「熱帯熱マラリア原虫の雄性ガメトサイトマーカー」 特願 2009-027156、**加藤健太郎(出願人)** 2009年2月9日
9. **Kato K***, Sudo A, Kobayashi K, Tohya Y, Akashi H. (2008) Characterization of *Plasmodium falciparum* protein kinase 2. **Mol Biochem Parasitol**. 162:87-95.
10. Sudo A, **Kato K***, Kobayashi K, Tohya Y, Akashi H. (2008) Susceptibility of *Plasmodium falciparum* cyclic AMP-dependent protein kinase and its mammalian homologue to the inhibitors. **Mol Biochem Parasitol**. 160:138-142.
11. **Kato K**, Mayer DC, Singh S, Reid M, Miller LH. (2005) Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 102:5552-5557.
12. Sijwali PS[†], **Kato K[†] († contributed equally.)**, Seydel KB, Gut J, Lehman J, Klemba M, Goldberg DE, Miller LH, Rosenthal PJ. (2004) *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 101:8721-8726.
13. **Kato K**, Yokoyama A, Tohya Y, Akashi H, Nishiyama Y, Kawaguchi Y. (2003) Identification of protein kinases responsible for phosphorylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein at serine-35, which regulates its coactivator function. **J Gen Virol**. 84:3381-3392.
14. Kawaguchi Y, **Kato K**. (2003) Protein kinases conserved in herpesviruses potentially share a function mimicking the cellular protein kinase cdc2. **Rev Med Virol**. 13: 331-340.
15. **Kato K**, Kawaguchi Y, Tanaka M, Igarashi M, Yokoyama A, Matsuda G, Kanamori M, Nakajima K, Nishimura Y., Shimojima M., Phung HTT, Takahashi E, Hirai K. (2001) Epstein-Barr virus-encoded protein kinase BGLF4 mediates hyperphosphorylation of cellular elongation factor 1 δ (EF-1 δ): EF-1 δ is universally modified by conserved protein kinases of herpesviruses in mammalian cells. **J Gen Virol**. 82: 1457-1463.
16. **Kato K**, Jang HK, Izumiya Y, Cai JS, Tsushima Y, Miyazawa T, Kai C, Mikami T. Identification of the Marek's disease virus serotype 2 genes homologous to the glycoprotein B (UL27), ICP18.5 (UL28) and major DNA-binding protein (UL29) genes of herpes simplex virus type 1. **J Vet Med Sci**. 61: 1161-1165. (1999)
17. **Kato K**, Jang HK, Izumiya Y, Cai JS, Tsushima Y, Miyazawa T, Kai C, Mikami T. (1999) Identification and sequence analysis of the Marek's disease virus serotype 2 homologous genes of the herpes simplex virus type 1 UL25, UL26 and UL26.5 genes. **J Vet Med Sci**. 61: 787-793.

Characterization of protein kinases of pathogens and these perspectives on drug targets

Kentaro Kato (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

akkato@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp