

上流域に誘導条件下で特異的に結合するタンパク因子等を検討する必要があると思われる。

## E. 結論

1) *T. brucei rhodesiense* 感染の急性モデルマウスに対して、アスコフラノンとグリセリンの同時投与による顕著な延命効果が確認された。

2) アスコクロリンは、反応中間体であるユピセミキノンのアナログとしてシトクロム  $bc_1$  複合体の Qi 部位に結合し 電子伝達を阻害すると同時に、Qo 部位にも作用することが確認された。

3) Alternative oxidase 核遺伝子の発現に亜鉛が必須の因子として関与していることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Minagawa, N., Kariya, H., Sakajo, S. and Yoshimoto, A. : Effects of dithiocarbamates on the expression of alternative oxidase in the yeast, *Hansenula anomala*, EBEC Short Report, **11**, 235 (2000)

2) Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S. and Kita, K. : Ascofuranone: a new chemotherapeutic agent for African trypanosomiasis, *Mahidol J.*, **7**, 37-43 (2000)

### 2. 学会発表

1) Minagawa, N., Kariya, H., Sakajo, S. and Yoshimoto, A. : Effects of Dithiocarbamates on the Expression of Alternative Oxidase in the Yeast,

*Hansenula anomala*, 11<sup>th</sup> European Bioenergetics conference, Brighton, UK (2000)

2) 皆川信子、籾義貞、鈴木高史、吉田彩子、太田伸生、坂上茂、吉本昭夫、永井和夫、北澤：アスコフラノンによるアフリカ睡眠病マウスモデルの治療効果、第73回日本生化学会(2000)

3) 刈屋春海、坂上茂、吉本昭夫、皆川信子：酵母 *Hansenula anomala* の Alternative Oxidase 核遺伝子発現における Dithiocarbamate 類の効果について、第73回日本生化学会(2000)

4) 皆川信子、刈屋春海、坂上茂、吉本昭夫：酵母 *Hansenula anomala* の Alternative Oxidase 核遺伝子発現における亜鉛の関与、日本農芸化学会2001年度大会(2001)

5) 坂上茂、吉本昭夫、皆川信子：糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるシアン耐性末端酸化酵素遺伝子の構造、日本農芸化学会2001年度大会(2001)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

アスコフラノンの体内動態  
分担研究者：細川 知良 応用生物研究所

研究要旨

実用化をめざす上で最も重要な問題点はアスコフラノンの体内動態と副作用についてである。そこでまず体内動態を解明するために、アイソトープでラベルした酢酸を基質として放射性アスコフラノンを作成し、ラットに経口投与した。投与後の血中、臓器中の放射能を測定してアスコフラノンの吸収、分布、排泄について検討した結果、アスコフラノンの血中濃度は投与後4時間後に最高値を示し、その後の血中からの消失は遅かった。

今回の実験結果よりトリパノソーマの生息する血流中でのアスコフラノンの濃度が経口投与によっても十分な高さを長時間にわたって維持されている事が判ったが、この事実はアスコフラノンの有効性を具体的に裏付けるものである。

A.研究目的

抗トリパノソーマ薬として実用化をめざす上で最も重要な問題点はアスコフラノンの体内動態と副作用についてである。そこでまず体内動態を解明するために、アイソトープでラベルしたアスコフラノンを作成し、投与後の血中、臓器中の放射能を測定してアスコフラノンの吸収、分布、排泄について検討した。

B.研究方法

1) 実験動物

雄性JCL-SDラットはすべて実験の前日夕刻から絶食状態におき、薬物投与投与4時間目から給餌した。

2) 標識アスコフラノン(AF)の調製

アスコフラノンの標識体は<sup>14</sup>C-酢酸を基質として発酵法により作製した。

3) 投与方法

2%アラビアゴムに懸濁した非標識アスコフラノンを添加して10mg/kgの割合になるように調製して、ゾンデで経口投与した。

4) 血中濃度の検討

ラット4例に<sup>14</sup>C-AFとAFを経口投与した後、0, 0.25, 0.5, 1.2, 4, 6, 8, 24, 48, 72時間目にラット尾静脈より採血し、その0.1mLをペーパーディスクにしみ込ませた。また、標準液もその一定量を同様にしみ込ませて、各々Packard Tri-Cable Sampleoxidizer 306型(以下 oxidizer)で燃焼させ<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>をCarbo-Serb (Packard)でtrapしシンチレーターPERMAFLOUR V(Packard)をくわえて液体シンチレーターカウンターで放射エネルギーを計測し、各々の値から"0"時間の値を差し引いて実測値とした。

5) 尿・糞中排泄の検討

<sup>14</sup>C-AF経口投与後2, 4, 6, 8, 24, 48, 72時間目に採尿した。なお、2, 4, 6時間目には採尿後、水道水2mLを強制的に経口投与した。各々、採尿後、その1mLをバイアルに移し、トルエン-トリイトンシンチレーター10mLを添加後、放射エネルギーを測定した。また、糞は24, 48, 72時間後に採集し十分乾燥後、全量を測定した。

6) 臓器内分布の検討

ラット3匹に<sup>14</sup>C-AFを経口投与した後、0.5, 4, 24時間目に各々エーテル麻酔下に開腹、心臓

穿刺により採血し、生理食塩水にて肝臓を還流し摘出した。他に、心、肺、脾、膵、腎、副腎、睾丸、脂肪を摘出した。各組織は全量を精秤後、その一部 (0.1-0.2g)又は全量を正確に切り取り、細片を濾紙上に乗せ濾紙とともに、oxidizerを用いて処理し放射能を測定した。

以上の動物実験においては動物愛護の精神に基づき、「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」に従って研究を進めた。

### C. 研究結果

#### 1) 血中濃度

経時的に採血し、放射能を測定した結果、最高血中濃度は投与後4時間目に見られ、このときの投与量当たりの割合は0.029%/mL、濃度は0.94  $\mu$ g/mLが得られた。最高血中濃度4時間目に対して2時間目、6時間目の値も比較的高く、4時間目の値に比較して大きな差を示さなかったことから吸収並びに血中からの消失は比較的緩慢であることが示唆された。投与後24時間目でも4時間目の値の1/2以上の値を示した。

#### 2) 尿・糞中排泄

ラットに<sup>14</sup>C-AFを経口投与し経時的に採尿あるいは採糞して放射能を測定した結果、尿中への排泄は0-72時間までの合計でも1%以下であった。これに対して、糞には約83%が排泄されており、しかも48-72時間後においても約11%が排泄されていることから72時間以後も主として糞から排泄されていることが推測された。

#### 3) 臓器内分布

<sup>14</sup>C-AF経口投与、0.5, 4, 24時間後の各臓器内の放射能を測定し、単位組織重量(g)当たりの放射活性を求めた。各臓器別では単位組織重量当たりの放射活性は肝の分布が最高値を示し、4時間目の3例の平均値は1.79%であった。また、他の臓器においては単位組織重量当たり

の濃度は低く、ほぼ同程度であった。経時的に比較した場合、膵、副腎、脂肪の最高濃度は30分後に認められたが、その他の臓器では4時間目に最高濃度が得られた。

### D. 考察

今回の実験結果よりトリパノソーマの生息する血流中でのアスコフラノンの濃度が経口投与によっても十分な高さを長時間にわたって維持されている事が判ったが、この事実はアスコフラノンの有効性を具体的に裏付けるものである。

### E. 結論

アスコフラノンの実用化をめざす上で最も重要な問題点である体内動態について解明するために、アイソトープでラベルしたアスコフラノンを作成し、投与後の血中、臓器中の放射能を測定してアスコフラノンの吸収、分布、排泄について検討した。その結果、トリパノソーマの生息する血流中でのアスコフラノンの濃度が経口投与によっても十分な高さを長時間にわたって維持されている事が判った。

### F. 研究発表 準備中

### G. 知的所有権の取得状況 なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染研究事業）  
分担研究報告書

アスコフラノンの標的である Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) cDNA の GUTat 3.1 株からのクローニングとその発現プロファイル解析

研究協力者： 鈴木高史  
名古屋市立大学医学部医動物学教室・助手

研究要旨

アスコフラノンの標的である Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) cDNA は *Trypanosoma brucei brucei* の EATRO110 株、TC221 株、ILTat1.4 の株から既にクローニングされている。しかし、将来的な薬剤のターゲットとしては、より多くの株、近縁種の TAO の解析を行う必要があると考えられる。そこで、今回新たに GUTat 3.1 株からの TAO cDNA クローニングを行った。その結果、GUTat 3.1 株の TAO の推定アミノ酸配列は ILTat1.4 で報告されているものと 100% 一致した。このことから TAO はトリパノソーマ原虫の生存に重要であり、これを標的とするアスコフラノンは薬剤として非常に有効であると考えられた。次に、TAO の long slender、short stumpy、procyclic の各フォームでの発現プロファイル解析を mRNA レベルとタンパクレベルとで行った。その結果、今まで long slender 特異的発現を行っていると考えられてきた TAO が mRNA レベルでは、全てのフォームで同様に発現が行われていることが明らかになった。また、抗 TAO モノクロナール抗体を用いた、Western blot 解析を行ったところ、procyclic form では通常の 34kDa ではなく、25.3kDa のバンドが見られた。

A. 研究目的

*Trypanosoma brucei brucei* とその類縁種はアフリカ睡眠病やナガナ病などの病原体として主としてサハラ以南のアフリカでヒトや家畜に甚大な被害をもたらしている重要な昆虫媒介性原虫である。しかしながらこれらのトリパノソーマ症に対する治療薬はヒトに対して 4 種類、家畜に対しては 2 種類あるのみであり、いずれも副作用が強い薬ばかりである。このような理由から副作用の少ない有効な薬剤の開発が期待されている。このような背景を元に、本新興再興感染症事業では新規薬剤としてのアスコフラノンの有効性検討と実用化

に向けての研究を行っているが、その標的である Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) cDNA は Hill らにより、*Trypanosoma brucei brucei* (EATRO110) 株から、また深井らにより、TC221、ILTat1.4 の株からクローニングされている。しかし、将来的な薬剤のターゲットとしては、より多くの株、近縁種の TAO の解析を行う必要があると考えられる。そこで、*Trypanosoma brucei brucei* の long slender、short stumpy、procyclic の各フォームで発現プロファイル解析が可能な GUTat 3.1 株から新しく TAO cDNA をクローニングし、各フォームでの発現を mRNA レベル、タンパクレベルで見

てみた。

## B. 研究材料と方法

### 1) トリパノソーマ原虫株

農林水産大臣の許可を得て、ケニア共和国ナイロビにある国際家畜疫病研究所 (ILRAD) から分与された *T. b. brucei* の GUTat 3.1 株を用いて、トリホマスティゴート型のうち、long slender 型と short stumpy 型とを、それぞれ *in vitro* の培養および BALB/c マウス腹腔からの回収虫体の DEAE カラムのクロマトグラフィーによって精製した。また同株の昆虫型 procyclic form については *in vitro* 培養のものを用いた。

### 2) cDNA cloning

GUTat 3.1 株 long slender 型から totalRNA を抽出し、逆転写により cDNA を作製した。Genbank データベース上の EATRO110 株の TAO cDNA 配列をもとに、よく保存されていると推定される ORF 部分に primer を設定し、PCR により増幅を行った。得られた PCR 産物を direct-sequence 解析した後に、3'RACE、5'RACE を行い、full-length cDNA 塩基配列情報を得た。

### 3) RT-PCR

GUTat 3.1 株 TAO cDNA の ORF 相当部分の全長を増幅できるように primer を設定し、long slender、short stumpy、procyclic の各フォームの cDNA に対して PCR により増幅を行った。

### 4) Western blot 解析

ILTat1.4 (L 型)と GUTat 3.1 株の procyclic form からミトコンドリア画分を精製した。吉田が作製した抗 TAO

モノクローナル抗体を用いて行った。

## C. 研究結果

GUTat 3.1 株 TAO cDNA の塩基配列を決定したところ、推定アミノ酸配列は深井らの報告した ILTat1.4 株と 100%一致した。次に得られた塩基配列を元に、ORF 相当部分の全長を増幅できるように primer を設定し、long slender、short stumpy、procyclic の各フォームの cDNA に対して PCR を行った結果、いずれのフォームでも同様な発現が見られた (図-1)。これ

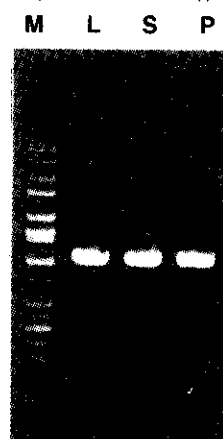


図-1. RT-PCR analysis was performed for GUTat3.1 long slender, short stumpy and procyclic forms. M, marker; L, long slender; S, short stumpy; P, procyclic. Each TAO cDNA-expression was confirmed by direct-sequence analysis. らの各バンドは、抽出精製を行い、direct-sequence により、TAO であることを確認した。そこで次にタンパクレベルでの発現をみるために、long slender 型のみが出現する ILTat1.4 株と GUTat 3.1 株の procyclic form からミトコンドリア画分を精製し、抗 TAO モノクローナル抗体を用いて Western blot を行った。その結果、ILTat1.4 株では 34kDa の位置にバンドを認め、GUTat 3.1 株の procyclic form では 25.3kDa の位置にバンドを認めた (図

-2)。

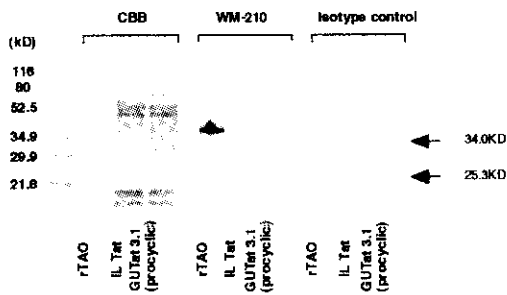


図-2. Western blot analysis was performed for ILTat1.4 (long slender) and GUTat3.1 procyclic forms; different-size bands (34kDa and 25.3kDa) are observed respectively.

#### D. 考察

GUTat 3.1 株 TAO cDNA を決定したところ推定アミノ酸配列は ILTat1.4 株と 100%一致した。このことから TAO はトリパノソーマ原虫の生存に重要であり、これを標的とするアスコフラノン薬剤として非常に有効であると考えられる。

TAO はミトコンドリア膜に存在し、電子伝達系の最終に位置し、血流型の long slender 型に特異的と考えられてきた。しかし、今回の結果から少なくとも mRNA レベルでは long slender、short stumpy、procyclic のいずれのフォームでも同様の発現が見られることが明らかになった。さらに Western blot の結果、long slender form である ILTat1.4 株では推定アミノ酸配列から予想される 34kDa の位置にバンドが見られたが、GUTat 3.1 株の procyclic form では 25.3kDa の低い位置に見られた。今回用いた抗 TAO モノクローナル抗体は N 末と C 末両方にエピトープをしている。同様に C 末のみを認識する抗 TAO モノクローナル抗体で Western blot を行った結

果ではバンドが見られなかったことから、C 末側が切られている可能性が考えられる。C 末側には Fe 結合サイト、各種 alternative oxidase で保存されているモチーフが存在している。シトクローム電子伝達系を用いる procyclic form では従来 TAO は発現していないと考えられていたが、C 末側が切られて不活性型になっている、あるいは N 末側が別の機能を併せ持つ可能性などが考えられる。

今後、アスコフラノンの実用化という観点から procyclic form で見られる、切断を受けていると推定されるフォームに関しての機能解析を進めるとともに、近縁の *Trypanosoma* 原虫から TAO をクローニングを行い、アスコフラノンの有効性を調べていく予定である。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担報告書

Trypanosome alternative oxidase (TAO)に対するモノクローナル抗体の作成と免疫学的解析

研究協力者：吉田彩子

ヒューマンサイエンス振興財団・リサーチレジデント

研究要旨

アスコフラノンのターゲットでシアン耐性末端酸化酵素 Trypanosome alternative oxidase (TAO)の生化学的解析を目的として、リコンビナントTAO (rTAO)に対するモノクローナル抗体を作成した。それぞれのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のアイソタイプは、WM-38およびWM-210はIgG1、WM-211はIgG2aであった。さらに、rTAOによる免疫血清は*T. b. brucei*、*T. vivax*のTAOと反応するが、これらのモノクローナル抗体は*T. b. brucei*のTAOとは反応するものの*T. vivax*のTAOとは反応せず、*T. b. brucei*のTAOに高い特異性を持つことが示された。また、固相化ペプチドを用いたスクリーニングによりそれぞれの抗体の認識するエピトープ解析を行ったところ、WM-38、WM-211の産生するモノクローナル抗体はrTAOの265-272を認識し、WM-210の産生するモノクローナル抗体はrTAOの69-80と264-272の2カ所に反応が見られたことからrTAOの立体構造を認識していると推察された。

A.研究目的

アフリカ睡眠病の病原体であるトリパノソーマは、表面抗原の変異により宿主の免疫機構を巧みに回避して寄生することから、トリパノソーマに対するワクチン開発は困難を極めている。現在のところ、治療法としては化学療法に頼るしかないが、治療薬はヒトで4種類、家畜で2種類しか実用化されておらず、その治療薬も有効性や副作用に問題があることから、より有効かつ副作用の少ない新薬の開発が期待されている。

このような背景をもとに、本新興再興感染症事業では有望な新薬として、高い抗トリパノソーマ活性を持つアスコフラノンの実用化を目標に研究を行ってきた。アスコフラノンはトリパノソーマ原虫の呼吸鎖におけるシアン耐性末端酸化酵素 Trypanosome alternative oxidase (TAO)を特異的に阻害することが明らかとなっている。しかしながら、アスコフラノンの作用機序やより有効な投与法の検討を行う

上で必要不可欠とされる、TAOの生化学的な性質、構造については未だ不明な点が多い。そこで、アスコフラノンのターゲットであるTAOの精製と生化学的解析を目的として、大腸菌を用いて作成したリコンビナントTAO (rTAO)に対するモノクローナル抗体の作成を行い、その特異性と認識エピトープについて解析を行った。

B.研究方法

1) モノクローナル抗体の作成

抗原として用いたrTAOは、本研究班主任研究者の北潔教授より分与をうけた。BALB/c系、雌、7週令のマウスをアジュバントとしてCFAを用いてrTAOで免疫し、抗体価の上昇を確認した後、脾臓細胞とミエローマ細胞 (P3X63) をポリエチレングリコールを用いて細胞融合させ、HAT培地を用いてハイブリドーマを選択した。rTAOに対する抗体産生陽性ウェルについては2回クローニングを行い、WM-38、

WM-210、WM-211の3クローンを樹立した。それぞれのクローンについては大量培養を行い、プリスタン0.5mlを1週間以上前に腹腔内投与したBALB/c系マウスの腹腔に $3 \times 10^6$ ずつ接種した後、腹腔内に貯留した腹水を穿刺により採取した。それぞれのクローンの産生する抗体のアイソタイプは、IsoStrip (Roche, IN, USA) を用いて決定した。

#### 2) モノクローナル抗体の特異性の検討

モノクローナル抗体の特異性はウエスタンブロッティング法により検討した。トリパノソーマ原虫株は農林水産大臣の許可のもとケニア共和国の国際家畜疫病研究所 (ILRAD) から分与された*T. b. brucei*および*T. vivax*を用いた。まず、感染マウス血液からDE52カラムを用いて精製した*T. b. brucei*および*T. vivax*それぞれのミトコンドリア画分とrTAOを抗原として電気泳動を行い、PVDF膜に転写した。抗体によるTAOの認識については、それぞれのモノクローナル抗体およびrTAO免疫血清を一次抗体、HRP標識抗マウスIgG抗体を二次抗体として反応させ、コニカイムノステインにより発色反応として検出した。

#### 3) モノクローナル抗体の認識エピトープの解析

モノクローナル抗体の認識エピトープの解析を行うにあたり、自動ペプチドスポット合成装置を用いて、rTAOのシーケンスに基づく9mer、2残基シフトおよび12mer、1残基シフトのペプチドをフィルターペーパー上に固相で合成した。それぞれのモノクローナル抗体と合成ペプチドとの結合は、multi dot-ELISA法に準じて発色反応として検出した。

#### 4) 倫理面での配慮

全ての動物実験は、名古屋市立大学の動物実験指針に従い、実験施設管理責任者の許可のもとに可能な限り苦痛を与えない方法で行われた。

### C. 研究結果

本研究においてハイブリドーマ株と

表1 Anti-Tao monoclonal antibodies

Clone	Isotype
WM-38	IgG1, $\kappa$
WM-210	IgG 2 a, $\kappa$
WM-211	IgG1, $\kappa$

して樹立した、WM-38、WM-210、WM-211の産生するrTAOに対するモノクローナル抗体のアイソタイプは表1に示したとおりである。

rTAOおよび*T. b. brucei*、*T. vivax*から精製した天然型のTAOに対する抗体反応をウエスタンブロッティング法で検討したところ、rTAOに対する免疫血清はrTAOのみならず*T. b. brucei*、*T. vivax*のTAOとも反応を示した。しかしながら、いずれのモノクローナル抗体もrTAO、*T. b. brucei*のTAOは認識したものの、*T. vivax*のTAOとの反応は認められなかった(図1)。

さらに、それぞれの抗体の認識するエピトープをフィルターペーパー上に合成した固相化ペプチドを用いてスクリーニングしたところ、WM-38、WM-211の産生するモノクローナル抗体はrTAOの265-272のペプチドと、WM-210の産生するモノクローナル抗体はrTAOの69-80と264-272の2カ所に反応が認められた(図2)。

### D. 考察

上記の結果より、ハイブリドーマWM-38、WM-210、WM-211の産生するモノクローナル抗体は*T. b. brucei*のTAOに高い特異性を示したことから、TAOの精製、虫体での局在や発現の有無、さらに生化学的な解析を行う上で非常に有用であると考えられた。また、WM-210の産生するモノクローナル抗体は、rTAOのアミノ酸配列の69-80と264-272の2カ所に反応が見られたことからrTAOの立体構造を認識しており、これらの部位はrTAOの立体構造上の非常に近い部位である可能性が示唆された。



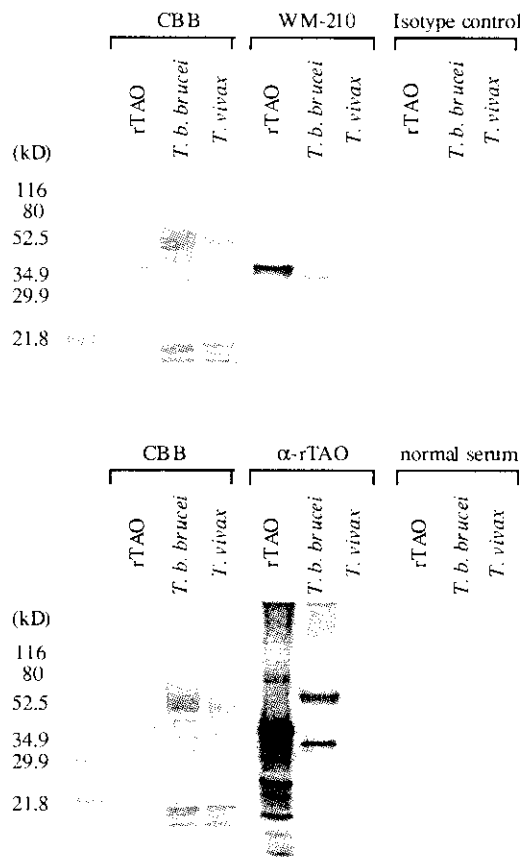


図1 Recognition of Trypanosome mitochondria proteins by anti-rTAO mAb, WM-210, and polyclonal Ab.

### E.結論

本研究で作成したモノクローナル抗体は、アスコフラノンのターゲットであるTAOの精製や生化学的解析を行う上で非常に有用であると考えられる。

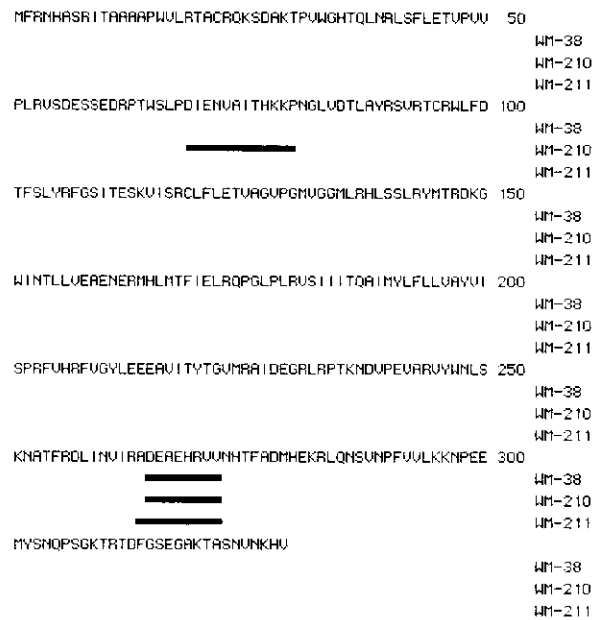


図2 Binding of anti-rTAO mAb, WM-38, WM-210 and WM-211, to solid phase peptides.

## 大腸菌で発現させた組み換え *Trypanosoma brucei brucei* シアン耐性ユビキノール酸化酵素の特徴

研究協力者： 二瓶 浩一

東京大学大学院医学系研究科 生物医化学教室

(財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・リサーチレジデント)

### 研究要旨

抗トリパノソーマ薬アスコフラノン、トリパノソーマ原虫のミトコンドリア内膜に局在するシアン耐性ユビキノール酸化酵素 (TAO) を標的とするプレニルフェノール誘導体である。一方、TAO は、トリパノソーマ原虫が哺乳動物体内期の活発に増殖する long slender (LS) 型虫体において機能していると考えられている。本研究では、アスコフラノンの標的分子 TAO の機能発現機構を明らかにする為に、大腸菌を用いた TAO の大量発現系の構築及び、TAO の精製を行い、一次構造、補欠分子族について解析した。ヘム合成変異 (*hemA*) 株に TAO をコードしたプラスミド DNA を導入し、膜画分を調製したところ、酵素活性の高い TAO 高発現膜標品が得られた。この膜標品を界面活性剤ジギトニンによる可溶化後、TAO の精製を行い、純度及び、酵素活性の高い TAO 標品が得られた。更に精製 TAO を質量分析を用いてアミノ酸配列解析を行ったところ、我々が遺伝子配列から推定していた TAO のアミノ酸配列と一致することが明らかになり、先に報告されていた米国の Hill らによる遺伝子配列から推定した TAO のアミノ酸配列と異なっていた。又、TAO の補欠分子族は、そのアミノ酸配列に二ヶ所の鉄結合モチーフ (-E-, -ExxH-) が存在することから、二分子の鉄が結合していると考えられている。そこで、TAO に含まれる鉄含有量の測定を原子吸光光度計を用いて行ったところ、実際の鉄含有量は、ポリペプチド一分子に対し、0.1 以下という非常に低い値を示す興味深い結果となった。

これまで困難とされていたシアン耐性ユビキノール酸化酵素の生化学的な解析が、本研究により初めて可能となり、今後、TAO の薬剤開発等、分子レベルでの解析が可能になるものと考えられる。

### A. 研究目的

トリパノソーマ原虫をはじめ、植物、菌類等にも存在するシアン耐性ユビキノール酸化酵素の生理的な役割又は、触媒機能、構造を含めた酵素学的性質の詳細は、未だ明らかにされていない。それは、シアン耐性ユビキノール酸化酵素が特殊な環境下で発現し、合成量が低いという制約がある上、

酵素自体が非常に不安定であることに起因している。本研究では、シアン耐性ユビキノール酸化酵素の一つ、TAO を大腸菌体内にて発現させることにより大量調製を可能にし、TAO の精製を行った。更に、精製した TAO を用いて、アミノ酸配列、補欠分子族の解析を行い、TAO の特徴について調べた。

## B. 研究方法

### 1) 大腸菌体内における TAO 発現系の構築

大腸菌体内で TAO と同じユビキノール酸化反応を触媒するシトクロム *bo* 及び *bd* 型末端ユビキノール酸化酵素は、その触媒機能にヘム分子を必要とする。それに対し、TAO は、ヘム分子を必要としない。そこで我々は、この差違を利用し、ヘム生合成能を欠損した  $\Delta hemA$  変異株を P1 ファージを用いた形質転換法にて調製した。この変異株 (FN102) に、TAO をコードしたプラスミド DNA (pTAO) を導入し、機能する末端ユビキノール酸化酵素が、TAO のみとする大腸菌 FN102/pTAO 株を得た。

### 2) 培地及び、培養条件

大腸菌は、LB 培地を用いて、37 °C (通常の培養) 又は、30 °C (IPTG 誘導後) にて培養した。大腸菌 FN102/pTAO 株及び、FN102/pET15b (-TAO) 株を培養する際、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリン、0.2% グルコースを LB 培地に添加した。更に、FN102/pTAO 株は、100  $\mu\text{M}$  の IPTG を添加し、TAO の合成を誘導させた。

### 3) 組み換え TAO の精製

FN102/pTAO 株の膜画分は、菌を 10 l 培地で培養後、菌体を EDTA/lysozyme 処理、French Press による細胞破碎処理を経て、調製した。その膜画分は、界面活性剤、ジギトニン (3%) を用いて可溶化した。可溶化上清から組み換え TAO をニッケルカラムを用いて精製した。

### 4) その他の解析

TAO のアミノ酸配列は、トリプシン処理後、得られたペプチド断片について、質

量分析を用いて解析した。TAO の補欠分子族と考えられている鉄の含有量は、原子吸光光度計を用いて測定した。

## C. 研究結果

これまでに、大腸菌体内に存在する末端ユビキノール酸化酵素 (*bo* 及び *bd* 型) の欠損変異株を用いて、TAO を発現させたところ、*bd* 型ユビキノール酸化酵素のアイソタイプが発現する為に、TAO の生化学的な解析は、非常に困難であった。以前行った我々の研究から、大腸菌の末端ユビキノール酸化酵素及び、コハク酸脱水素酵素の機能又は、構造形成にヘム分子が必要であることが明らかになっていた (Nihei *et al.* 2001)。そこで、ヘム生合成能欠損株 ( $\Delta hemA$ ) を用いることにより、ヘム分子を含まずに機能する好氣的呼吸鎖における初発酵素 NADH 還元酵素から、ユビキノンを介して、TAO に電子伝達をする大腸菌変異株 (FN102/pTAO) を構築した。その結果、FN102/pTAO 株は、TAO に依存した好氣的呼吸をする大腸菌変異株であり (図 1)、膜画分に非常に高い酵素活性が局在することが明らかになった (表 1)。更に細胞の膜画分の約 70% が TAO という TAO 高発現株であることも明らかになった。次に、FN102/pTAO 株を用いて、膜の可溶化及び、TAO の精製を行った。数十種類の界面活性剤を試した中、ジギトニンが TAO の可溶化に適していることが明らかになった。組み換え TAO の N 末端に His-tag が結合していることを利用し、ニッケルカラムを用いて TAO を精製した。その結果、ピーク位置にほぼ単一バンドの

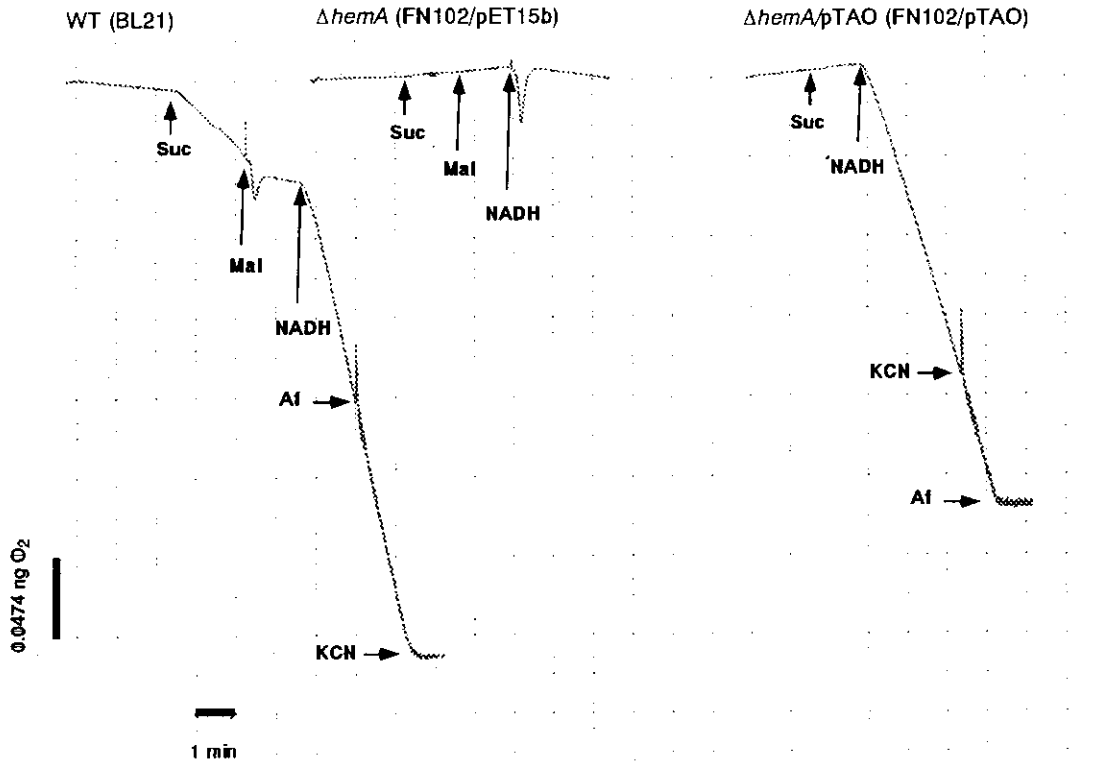


図 1. TAO-dependent aerobic respiration in *E. coli hem* mutant. Suc, succinate; Mal, malonate; AF, ascofuranon. Assay was done at 25 °C.

酵素標品が得られた。この精製によって、約 50  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein という非常に活性の高い TAO を得ることが出来た。更に、精製 TAO を用いて、アミノ酸配列の解析、及び、補欠分子族と考えられている鉄含有量の測定を行った。その結果、アミノ酸配列を質量分析を用いて解析したところ、先に報告されていた米国の Hill らによる TAO の遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列と鉄結合モチーフを含む C 末端領域において異なっていることが明らかとなった。一方、TAO の補欠分子族は、そのアミノ酸配列に二ヶ所の鉄結合モチーフ (-E-, -ExxH-) が存在することから、ポリペプチド一分子に対し、二分子の鉄が結合していると考えられている。しかし興味深いことに、原子吸光光度計を用いて鉄

含有量を調べたところ、得られた TAO は、非常に活性が高かったのにも関わらず、鉄の含有量がポリペプチド一分子に対し、0.1 以下という非常に低い値を示した。

表 1. Ubiquinol oxidase activity in TAO-expressed *E. coli hemA* mutant, FN102/pTAO.

Fraction	Specific activity
	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein
<u>FN102/pET15b (-TAO)</u>	
Membrane	0
<u>FN102/pTAO (+TAO)</u>	
Inclusion body	3.73
Homogenate	0.887
Cytoplasm	0.0283
Membrane	9.91

#### D. 考察

シアン耐性ユビキノール酸化酵素は、植物、菌類、トリパノソーマを初めとする一部の原虫のミトコンドリアに存在し、細胞又は、遺伝子レベルでの解析等から、その共通性は、明らかになりつつあるが、酵素、タンパク質としての性質は、殆ど解析されていない。その理由として、シアン耐性ユビキノール酸化酵素が非常に不安定であり、生物種を問わず十分な活性を保った形で酵素を得るのが非常に難しいということに起因していた。このような現状の中、大腸菌発現系を用いてシアン耐性ユビキノール酸化酵素の精製を可能にしたのは、本研究が初めてである。しかし、立体構造解析等の薬品開発をするのに重要な物理化学的な解析をする為には、現状より、高濃度で、且つ、更に安定な TAO 標品を得る条件検討を今後しなければならない。

TAO における問題の一つとして、遺伝子配列から推定されていたアミノ酸配列が、我々と先に報告していた米国の Hill らとの間で異なることであった。機能的に重要なドメインにおいて、アミノ酸配列が一致している部分があるにも関わらず、特に C 末端及び、鉄結合部位付近の領域において異なっていた。Hill らが材料としている EATRO110 株と我々が材料としている株 (TC221、ILTat1.4) 間の違いがあるものの、我々のグループと名古屋市立大の鈴木らが最近調べた GUTat3.1 株間においては、遺伝子配列が一致していることが明らかになっている。今回、精製した TAO を用いてアミノ酸配列を解析したところ、ちょうど Hill らの配列 (-CKTVSTPSLYLK-) と

異なっていた 284 から 293 番目の位置 (-LONSVNPFVVLK-) において、我々が遺伝子配列から推定していた配列と一致する結果となった。これは、株間における差違が存在することも否定できないが、おそらく Hill らが遺伝子配列の読み違いをしたものと考えられる。

FN102/pTAO 株から精製した組み換え TAO は、非常に活性が高く、又、FN102/pTAO 株の増殖には、鉄は必須要素であったにも関わらず、鉄含有量が予想される値 (2.00) よりも遥かに下回っていた。これは、組み換え TAO に含まれる鉄が非常に解離し易い状態にあるか、試料調製の際にポリペプチドから鉄が外れたものと考えられる。又は、鉄が TAO の構造形成過程において、必須要素としての役割を果たした後、解離するのかもしれない。この点については、鉄結合モチーフの変異体を作成する等の検討が必要であり、現在、解析中である。

今後、更に高純度且つ、安定な酵素標品を得て、分子動力的な解析、更に、X 線結晶解析による立体構造解析によって、鉄の結合、キノール酸化、酸素還元反応に関与するアミノ酸残基、更にアスコフラノンの作用部位の同定等、詳細を明らかにして行くことが重要である。これらの情報により、TAO を標的とした抗トリパノソーマ薬の分子設計が可能になると考えられる。

#### E. 結論

本研究により、TAO の精製を可能にし、タンパク質標品を用いた TAO の解析が可能になった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nihei, C., Nakayashiki, T., Nakamura, K., Inokuchi, H., Gennis, R. B., Kojima, S., Kita, K. (2001) Abortive assembly of succinate-ubiquinone reductase in a ferrochelatase-deficient mutant of *Escherichia coli*.

Molecular and General Genetics, in press.

Fukai, Y., Nihei, C., Kawai, K., Suzuki, T., Yabu, Y., Ohta, N., Nagai, K., Kita, K. (2001) Characterization of *Trypanosoma brucei brucei* alternative ubiquinol oxidase in a heme-deficient mutant of *Escherichia coli*.

*FEBS letter*, submitting

2. 学会発表

1) Functional expression of the ascofuranone-sensitive *Trypanosoma brucei brucei* alternative oxidase in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*.

Kawai, K., Nihei, C., Fukai, Y., Hisako, A., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Kita, K.

Thirty-fifth Joint Conference on Parasitic Diseases. July, 2000

2) Abortive assembly of succinate-ubiquinone reductase in a ferrochelatase-deficient mutant of *Escherichia coli*.

Nihei, C., Nakayashiki, T., Nakamura, K., Inokuchi, H., Gennis, B. R., Kojima, S., Kita, K.

The Third International Conference on Oxygenase. November, 2000

3) 大腸菌で発現させた組み換え *Trypanosoma brucei brucei* シアン耐性ユビキノール酸化酵素の特徴

二瓶 浩一、河合 敬介、深井 義久、  
藪 義貞、永井 和男、北 潔

平成 12 年度日米医学協力研究会、平成 13 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

特になし。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

#### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
北 潔	呼吸系の環境適応 -寄生に伴う大胆な再編成-	吉田賢右 茂木立志	生体膜のエネルギー装置	共立出版	東京	2000	47-59
北 潔	寄生虫・原虫感染症	井上圭三	医療薬学III	東京化学同人	東京	2000	316-326

#### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukai, Y., Amino, H., Hirawake, H., Yabu, Y., Ohta, N., Minagawa, N., Sakajo, S., Yoshimoto, A., Nagai, K., Takamiya, S., Kojima, S., and Kita, K.	Ascofuranone: A new chemotherapeutic agent for African Trypanosomiasis	Mahidol J.	7	37-43	2000
Omura, S., Miyadera, H., Ui, H., Shiomi, K., Yamaguchi, Y., Masuma, R. Nagamitsu, T., Iwai, Y., Takano D., Sunazuka, T., Harder, A., Kölbl, H., Namikoshi, M., Miyoshi, H., Sakamoto, K., and Kita, K.	An anthelmintic compound nafuredin shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria	Proc. Natl. Sci Acad. USA	98	60-62	2001
Kita, K., Miyadera, H., Saruta, F., and Miyoshi H.	Parasite mitochondria as a target for chemotherapy	J. Health Sci.		印刷中	2001

寄生虫の宿主適応とミトコンドリア呼吸鎖の進化. 寄生適応における酵  
素進化の役割

北 潔

医学のあゆみ. Vol.193 No.3, pp.196-197, 2000



20000529

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。