

厚生科学研究費補助金（研究事業）  
分担研究報告書

原虫症治療標的分子の機能解析

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要不可欠である事から特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになりつつある。我々はマラリア原虫およびトリパノソーマのミトコンドリアを薬剤標的として捉え、特に呼吸鎖電子伝達系に関して、その特異的な性質を明らかにした。

A. 研究目的

我々は寄生適応に必須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、寄生虫ミトコンドリアが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させる事によって宿主内の環境に適応している事を明らかにしてきた。この成果をふまえマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析する事により、最終的に化学療法標的として捉えたいと考えている。そこで、熱帯熱マラリア原虫におけるエネルギー代謝系を先端的なエネルギー転換系研究の視点から追求し、さらにトリパノソーマなど他の寄生原虫も含め寄生現象全般に共通する適応戦略の分子基盤とその多様性を明らかにする事を目的として研究を進めている。

B. 研究方法

赤血球内型マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は化学療法剤の標的として期待されている。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたものであり、これが研究の進展を妨げている。そこで活性を保持したミトコンドリアの単離法

検討し、その結果ネズミマラリア原虫の系を用いて生化学的な解析が可能な量のミトコンドリアの調製法を確立した。またマラリア原虫にはアピコプラストと呼ばれる 35 kb の環状 DNA を持つオルガネラが存在し、マラリア原虫の増殖に必須な機能を有している。電子顕微鏡による観察から両者が細胞の中で常に近傍に局在している事が報告されている。そこでこの2つのオルガネラの相互作用を調べ、さらにそれぞれの機能を独立に解析する目的で細胞分画における挙動を調べて来た。昨年度までに確立した方法により、同一容量の培地から高島、見市らの以前の方法で調製した熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリア（約 1 mg）に比べ 3 倍以上の粗ミトコンドリアを得る事が可能となり、複合体 II のコハク酸-ユビキノン還元酵素の比活性も 3 倍以上に上昇した。これは河原らによるネズミマラリア原虫 (*P. yoelii*) の場合のマウス 5 匹分に相当し、熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリアの生化学的な解析に十分な高活性の粗ミトコンドリア調製法が確立できた。また、Percoll による分離の後の Western プロットおよび各種酵素活性の解析からミトコンドリアとアピコプラストを再現性良く分離している事が明ら

かとなった。実際にこのミトコンドリア画分を用いる事によって初めて複合体 II の Clear native electrophoresis が可能となり、コハク酸脱水素酵素活性による染色でウシ心筋複合体 II と同様なサイズを示す事が判った。そこで本年度はこのミトコンドリアのマーカー酵素としても知られている複合体 II の生理的意義を明らかにする目的でネズミマラリア原虫を用いて Fp サブユニットの遺伝子破壊を行ない、その効果を調べた。

また、アフリカトリパノソーマに関しては、極めて低濃度で効果を示す抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの標的であるシアン耐性酸化酵素のタンパク質としての性質を調べる目的で、これまでに組換え酵素を用い高純度で高活性の酵素の精製法を確立し、この精製標品を用いてアスコフラノンやその誘導体との共結晶を得てその結合様式を明らかにできた。そして昨年度は実際にこれらの誘導体の培養型のトリパノソーマの増殖阻害について調べた。そこで今年度はこのアスコフラノンの実用化をめざし、その安全性を確認するために哺乳類細胞について増殖阻害を調べた。

また 中南米のトリパノソーマ症 Chagas 病の病原体である *Trypanosoma cruzi* のレドックス調節に関わる酵素群の立体構造に基づく薬剤の分子設計を進めているが、ミトコンドリアの複合体 II (SQR) に関して精製を試みたところ *T. cruzi* 酵素は 12 種類のサブユニット (7.3~62 kDa) で構成される二量体酵素 (286.5 kDa x 2) で、哺乳類や出芽酵母の 4 サブユニット型酵素 (約 130 kDa) とは大きく異なっていた。また本酵素は複合体 II の特異的阻害剤に対する感受性が哺乳類の酵素と大きく異なっており、実際に酵素活性を最も強く阻害するアトペニン原虫の増殖を抑制する事から、薬剤標的として極めて有望と考えられた。そこでその立体構造を解析する

目的で大量培養が可能でヒトへの感染の危険性がないトリパノソーマ科鞭毛虫類の一種で爬虫類に寄生する *Leishmania tarentolae* を用いる事とした。これまでに *L. tarentolae* の培養において液体培地 10 L 当たりから 3 g 以上の大量のミトコンドリアを得る条件を確立し、複合体 II (LtSQR) の精製を検討したところ *T. cruzi* 同様に 10~12 のサブユニットの部分精製標品を得る事ができた。本年度はさらにその精製法を改良し、純度の高い標品の精製法を試み、この標品を用いて各サブユニットのアミノ酸配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究はほとんどが invitro の実験系であり、またネズミマラリア原虫の実験は東京大学医学部の動物実験指針に従って行ったもので、倫理面の問題はない。

## C. 研究結果

### 【マラリア原虫】

多くの真核生物においてミトコンドリアは TCA 回路および電子伝達系を通じた酸化的リン酸化による ATP 産生の場として、エネルギー代謝における重要な役割を担っている。しかし、赤血球内期マラリア原虫は細胞質における解糖系のみによってエネルギー代謝を行なっていると考えられてきた。一方で、マラリア原虫は TCA 回路および電子伝達系に必要な酵素のほぼ全ての遺伝子を持ち合わせており、酸化的リン酸化のマラリア原虫における生理的意義は明らかになっていなかった。マラリア原虫 TCA 回路および電子伝達系の役割を明らかにするため、マウスマラリア原虫を用い、ミトコンドリアのマーカー酵素で TCA 回路と電子伝達系を直接結ぶ複合体 II (コハク酸-ユビキノン還元酵素) の触媒部位である Fp サブユニット遺伝子 (*Pbsdha*) 破壊株を

作製し、その表現型解析を行った。*Pbsdha* 遺伝子破壊原虫は赤血球内ステージにおいてマウス体内で正常に発育した。しかし、蚊ステージであるオーキネートの形成が大きく阻害され、さらにはオーシストを全く形成しなかった。また、*Pbsdha* 遺伝子破壊原虫のマウスへの感染は観察されなかった。これらの結果は、マラリア原虫は脊椎動物宿主体内と昆虫ベクター体内において、前者では解糖系、後者では酸化的リン酸化とエネルギー代謝系を切り替えている事が明らかになった。

#### 【アフリカトリパノソーマ】

本年度は宿主哺乳類に対するアスコフラノンとその誘導体の影響に関して知見を得るため、アスコフラノンと同様に糸状菌が産生し構造の類似しているアスコクロリンが阻害するミトコンドリア呼吸鎖複合体 II-III に対する構造活性相関解析を行った。複合体 III は TAO と同様ユビキノール結合部位を持つため、アスコクロリン同様にアスコフラノン誘導体により阻害される可能性がある。構造活性相関解析の結果、組み換え TAO に対する阻害効果を増強させる芳香環内メチル基は、複合体 II-III に対する阻害活性を低下させる事、リンカーの構造が複合体 II-III の阻害活性に大きく影響する事、培養原虫に対する阻害効果を増強させる誘導体末端のピパロイル基は、複合体 II-III に対する阻害活性には影響しないことが明らかとなった。

#### 【アメリカトリパノソーマ】

昨年度までに解析に必要な精製標品を再現性良く大量に得られる条件を確立する目的で、原虫の培養条件を検討した結果、YE 培地で *L. tarentolae* の 10 L 培養を行うと、*T. cruzi* 10 L 培養時の 10 倍量の SQR 活性をミトコンドリア画分に分離できる事が判った。またポリエ

チレングリコール沈殿とイオン交換カラム Fractogel の併用により、高純度の LtSQR 標品を mg オーダーで調製可能な大量精製系を確立する事ができた。今年度はこの方法をさらに改良した。すなわち、50 mg のミトコンドリア画分から LtSQR を非イオン界面活性剤 Sucrose monolaurate で可溶化し、ポリエチレングリコール 3350 (PEG3350) によって沈殿させると、ミトコンドリア時の 50 % の SQR 酵素活性を保ったまま比活性が 3.1 倍に上昇した。その後、イオン交換カラム DEAE sepharose に標品を吸着させ、非イオン性界面活性剤を含む緩衝液でカラムを洗浄し SQR を溶出した。溶出標品の SQR 酵素活性はミトコンドリア画分の 4.3 % で、その比活性は 23 倍 (2.65 mmol/min/mg) に上昇した。溶出画分の 4-16 % hrCNE および SDH 活性染色の結果から LtSQR の分子量は約 520 kDa と推定された。また標品の hrCNE/Tricine-SDS PAGE 二次元電気泳動を行うと、一次元目で SDH 活性染色により標識されたバンドから計 12 本のバンドが検出され、これらを MALDI-TOF-LC-MS/MS によって分析した結果、合計 9 種類の LtSQR サブユニット SDH1 (69 kDa)、SDH<sub>2c</sub> (23 kDa)、SDH<sub>2N</sub> (27 kDa)、SDH3 (13~15 kDa)、SDH4 (9 kDa)、SDH5 (59 kDa)、SDH6 (37 kDa)、SDH7 (23 kDa)、SDH8 (19 kDa) について、次世代シーケンサーで配列決定したゲノム上の各候補サブユニットの予想アミノ酸配列と一致する断片を確認する事ができた。

#### D. 考察

これまで赤血球内ステージ原虫を用いた研究では、マラリア原虫はグルコースを用いた解糖系による ATP 産生を行なっていると考えられ、TCA 回路や電子伝達系の機能は不明なままであった。本研究において蚊のステージに注目した結果、マラリア原虫 TCA 回路酵素

がオーキネートからオーシスト形成にかけての原虫にとって必須であることを初めて示すことができた。蚊の体腔液内の糖はグルコースではなくトレハロースであり、グルコースが枯渇することにより代替炭素源として体腔液内のアミノ酸を用いている可能性がある。また、オーシストからオーキネートのステージは中町内から中腸壁細胞表面への移動が起こるため、酸素が増加する環境にあると考えられ、アミノ酸を用いた酸化的リン酸化によるATP産生を行なっていると考えられる。

我々が見出し、開発中のアスコフラノンは、現在最も強力な抗トリパノソーマ薬とされ、その標的はトリパノソーマのミトコンドリアに局在するシアン耐性酸化酵素である。しかしそのタンパク質としての性質は酵素が極めて不安定であるため、ほとんど判っていなかった。酵素学的な解析に加え、結晶を得る事ができた事は鉄を2分子含む膜結合性の2核鉄(di-iron)タンパク質としては初めての報告である。さらに今回アスコフラノンおよびその誘導体が哺乳類細胞の増殖に影響を与えない事が判った事はその実用化へ大きく前進したと考えられる。

複合体II(コハク酸-ユビキノ還元酵素)はTCA回路の酵素中唯一の膜結合性の酵素であり、ミトコンドリアのマーカー酵素として知られている。本酵素は呼吸鎖の脱水素酵素としてコハク酸からの還元力を呼吸鎖のユビキノに伝達し、TCA回路と呼吸鎖を直接結ぶ重要な酵素であり、宿主哺乳類ばかりでなく、寄生虫においてもそのエネルギー代謝に大きな役割を果たしている。これまで、そのサブユニット構造はヒトから細菌まで基本的には4つとされていたが、我々は*T. cruzi*の複合体IIが12サブユニットから構成される事を明らかにし、寄生虫の持つ多様性がさらに明確になった。この構造はアフリカトリパ

ノソーマやリーシュマニアにも共通しており、12サブユニットの複合体IIに対する特異的阻害剤を探索する事によって、極めて作用スペクトルの広い抗原虫薬の開発が期待される。*L. tarentolae*に関してはすでに次世代シーケンサーを用いて全ゲノムの塩基配列の情報を得ており、この解析結果からも*L. tarentolae*の複合体IIは*T. cruzi*の複合体II同様に12のサブユニットを持ち、さらに極めて類似したアミノ酸配列を持つ事を確認している。*L. tarentolae*の複合体IIの新規な立体構造を解析する事によって、これまで我々が*T. cruzi*のジヒドロオロト酸脱水素酵素で行なって来たのと同様に薬剤の分子設計が可能になると考えられる。同時に精製標品を用いた化合物ライブラリーのスクリーニングも可能となり、特異的阻害剤探索の基盤が整った。実際に*L. tarentolae*の複合体IIや*T. cruzi*の複合体IIを特異的に阻害するシッカニンを見出しており、しかも予備的な実験からシッカニンが*T. cruzi*のアマスティゴートの増殖を阻害する事が判り、リード化合物として大いに期待できる。

#### E. 結論

マラリア原虫やトリパノソーマなど寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになった。実用化へ向けて、次のステップへ進みたい。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

- 1) Molecular interaction of the first 3 enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. Nara, T., Hashimoto, M., Hirawake, H., Liao, C-W., Fukai, Y., Suzuki, S., Tsubouchi, A., Morales, J., Takamiya, S., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Fan, C-K., Inaoka, D. K., Inoue, M., Tanaka, A., Harada, S., Kita, K. and Aoki, T. (2012) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 418, 140-143
- 2) Critical importance of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. Hashimoto, M., Morales, J., Fukai, Y., Suzuki, S., Takamiya, S., Tsubouchi, A., Inoue, S., Inoue, M., Kita, K., Harada, S., Tanaka, A., Aoki, T. and Nara, T. (2012) **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 417, 1002-1006
- 3) Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: from parasites to cancer cells. Sakai, C., Tomitsuk, E., Esumi, H., Harada, S. and Kita, K. (2012) **Biochim. Biophys. Acta** 1820, 643-651
- 4) Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. and Kita, K. (2012) **J. Biochem.** 151, 589-592
- 5) Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. Hino, A., Hirai, M., Tanaka, Q. T., Watanabe, Y., Matsuoka, H. and Kita, K. (2012) **J. Biochem.** 152, 259-268
- 6) Towards understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: gene targeting of the Fp subunit. Tanaka, Q. T., Hirai, M., Watanabe, Y. and Kita, K. (2012) **Parasitol. Int.** 61, 726-728
- 7) Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N. and Mizushima, N. (2012) **PLoS ONE** 7(8), e42977
- 8) Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. Tachibana S, Sullivan SA, Kawai S, Nakamura S, Kim HR, Goto N, Arisue N, Palacpac NM, Honma H, Yagi M, Tougan T, Katakai Y, Kaneko O, Mita T, Kita K, Yasutomi Y, Sutton PL, Shakhbatyan R, Horii T, Yasunaga T, Barnwell JW, Escalante AA, Carlton JM, Tanabe K. (2012) **Nat Genet**, 44(9): 1051-5.
- 9) Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., Kita, K. and Tanabe, K. **BMC Genomics**, in press
- 10) Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and Kita, K. **J. Biochem.** in press
- 11) Structure of the trypanosome cyanide-insensitive alternative oxidase, a promising drug target. Shiba, T., Kido, Y., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Tsuge, C., Tatsumi, R., Takahashi, G., Balogun, E. O., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S.,

Saimoto, H., Moore, M. L., Harada, S.  
and Kita, K. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**,  
in press

学会発表

- 1) 北 潔 「化学療法の標的としての  
寄生虫ミトコンドリアとその多様  
性の解析」  
第 53 回日本熱帯医学会大会  
平成 24 年 9 月 (帯広)
- 2) Kita, Kiyoshi 「 Mitochondrial fumarate  
reductase as a target of chemotherapy:  
from parasites to cancer cells 」 The 2<sup>nd</sup>  
UCL JSPS international Symposium  
Mitochondria - from the fundamental  
aspects to medical importance -  
2012, June (London)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし