

地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」

研究協力者 報告書

人獣共通寄生原虫・蠕虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析

研究協力者 順天堂大学大学院医学研究科 生体防御寄生虫学教室 奈良武司

## 研究要旨

寄生原虫トリパノソームを含む分類群であるキネトプラスチダ類に特有のオルガネラ、グリコソームは、特殊化したペルオキシソームであり、解糖系 10 酵素のうちの初段 7 酵素や核酸合成酵素群を含むという特徴を持つ。これらの酵素は生存に必須であることから、トリパノソーム症の薬剤標的として有望である。本研究では、グリコソームの成立起原およびその生理学的意義の解明に向けて、キネトプラスチダ類の姉妹系統群であるディプロネマ類に着目し、ディプロネマ *Diplonema papillatum* のドラフトゲノム解読を行ない、糖代謝酵素群の遺伝子の同定を試みた。ディプロネマの推定ゲノムサイズは 176 Mb で、トリパノソーム類のゲノム（26～36 Mb）と比較して大きく、遺伝子内にイントロンが存在することが明らかとなった。糖代謝関連酵素群およびグリコソームまたはペルオキシソーム局在性酵素をコードする遺伝子を同定し、酵素の一次構造の特徴を解析した。これらの結果と生化学的解析結果を合わせ、ディプロネマ類とキネトプラスチダ類の共通祖先で起きた代謝経路の再編成について考察する。

### A. 研究目的

新興・再興感染症のなかでもトリパノソーム症や日本住血吸虫症などの人獣共通寄生虫症では、保虫宿主の存在が流行地での対策を困難なものにしている。本研究では、これら寄生原虫・蠕虫の持つ特異な生物学的特徴を同定・解析し、そこから得られた成果を応用して新規治療薬開発およびワクチン開発を行なうことを最終目的とする。

我々は、寄生原虫トリパノソームを対象として代謝経路とオルガネラの共進化、特に代謝経路酵素の局在が変わることの生理的意義、およびオルガネラの機能転換が起こる際の進化の原動力、特に遺伝子水平転移の果たす役割の解明を目指して研究を進めている。寄生原虫トリパノソームを含むキネトプラスチダ類にのみ存在するオルガネラ、グリコソームは、10 酵素からなる解糖系の初段 7 酵素や核酸合成酵素群を含み、これらのグリコソーム局在性酵素はヒトのオルソログとは異なる局在性や生化学的性状を持つことから、トリパノソーム症治療薬の標的として有望視されて

いる。グリコソームはペルオキシソームと共通する移行シグナル（PTS）を持つなど、両者の生化学的類縁性が示唆されている。

これまでの研究から、我々はキネトプラスチダ類とともにユーグレノゾア生物群に分類され、キネトプラスチダ類と共通祖先を持つディプロネマ *Diplonema papillatum* (ATCC 50162) において、解糖系第 4 酵素 fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) がペルオキシソーム様オルガネラに局在することを明らかにした (Makiuchi, *et al.*, *Protist* 126: 482, 2011)。一方、トリパノソームの解糖系 10 酵素のうち最初の 7 酵素がグリコソーム局在性であるのに対し、ディプロネマでは FBPA のみが小胞局在であり、グリコソーム成立の前段階として解糖カスケードの遮断が起きた可能性が示唆される (未発表)。そこで本年度は、トリパノソーム類とディプロネマとの比較ゲノミクス的アプローチから、酵素群の局在変更の生理的意義の解明を試みた。

## B. 研究方法

ディプロネマ *Diplonema papillatum* (ATCC 50162)より核ゲノムDNAを精製した。培養した *D. papillatum* を破碎後、遠心分離法を用いて核画分を調製後、DNAを抽出した。得られたDNAは、核DNAに加えミトコンドリアDNAと考えられる短鎖長のDNAを大量に含んでいたため、改めてアガロースゲル電気泳動を行ない、核DNAに相当するゲル片を回収後、DNAを生成した。得られた *D. papillatum* 核DNAを用いたゲノム配列の決定は、タカラバイオ(株)に委託した。塩基配列の決定はHiSeqシステム(イルミナ社)を用いた。

## C. 結果

ディプロネマの推定ゲノムサイズは176 Mbであった。残念ながら、塩基配列決定に用いたHiSeqはペアエンドリード長が短く(100 bp)、得られた平均コンティグ長は4.8 Kb、最大コンティグ長は62 Kbであった。ディプロネマのゲノムサイズはトリパノソーマ類のゲノム(26~36 Mb)と比較して大きく、遺伝子内にイントロンが存在することが明らかとなった。遺伝子のアノテーションについては、参照ゲノムとしてトリパノソーマ類3種(*Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Leishmania major*)のゲノム配列を用いた。残念ながら、特に多数のイントロンを含む遺伝子ではアノテーションが不十分であったため、目的遺伝子の同定に際してはマニュアルでBLAST検索を行なった。最終的に、糖代謝関連酵素群およびグリコソームまたはペルオキシソーム局在性酵素の遺伝子を同定し、酵素の一次構造の特徴を解析した。

解糖系酵素については、第6酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を除く初段6酵素および glucokinase が、トリパノソーマ酵素同様にPTSを持つことが明らかとなった。他の糖代謝関連酵素については、糖新生経路の重要な酵素である fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)にもPTSが存在していた。

ペルオキシソームには局在せず、グリコソームにのみ局在する酵素群として、核酸合成関連酵素が挙げられる。興味深いことに、トリパノソーマではPTSが付加されている酵

素(adenine phosphoribosyltransferase (APRT)、hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)、inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH)、adenylate kinase (ADK)、orotate phosphoribosyltransferase (OPRT)、deoxyribose-phosphate aldolase (DERA))は、ディプロネマではHGPRTを除きPTSが検出されなかった。

次に、キネトプラスチダ類とディプロネマ類とともにPTSを持つ酵素が共通起原を持つかどうかを明らかにするため、分子系統樹を作成した。解糖系第3酵素 phosphofructokinase (PFK)、GAPDHおよびFBPaseの分子系統解析の結果、キネトプラスチダ類とディプロネマ類は単系統を示さず、どちらかのグループで特異的に遺伝子水平転移が起きたことが明らかとなった。

## D. 考察

本研究において、ディプロネマの糖代謝関連遺伝子群の同定に成功した。そのうち解糖系第1酵素 hexokinase (HK)、第2酵素 glucose phosphate isomerase (GPI)、第3酵素 PFK、第4酵素 FBPA、第5酵素 triose-phosphate isomerase (TIM)および第7酵素 phosphoglycerate kinase (PGK)は、トリパノソーマ酵素と同様にPTSを持つことが明らかとなった。PTSにはタンバクのN端部のPTS2およびC末端のPTS1の2タイプが存在し、キネトプラスチダ類とディプロネマの両者に共通してHK、FBPAにPTS2が、GPI、PFK、TIM、PGKにPTS1が、それぞれ存在する。これらの結果は、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の共通祖先において、解糖系酵素群のペルオキシソーム移行が起きたことを強く示唆している。興味深いことに、PFK(PTS1タイプ)およびGAPDH(PTS無し)は、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の間で異なる起原を持つことが示唆される。また、糖新生関連酵素のうちFBPaseはキネトプラスチダ類とディプロネマのどちらもPTS1を持つ一方、酵素遺伝子の起原は異なることが強く示唆された。これらは、両群の間で異なる代謝プロファイルを発達させる過程で獲得されたものと考えられる。

キネトプラスチダ類では解糖系初段7酵素に加えて、他の代謝経路酵素がペルオキシソームに特異的に局在することが知られている。核酸合成関連酵素について、ディプロネマでは

HGPRT においてのみ PTS1 が検出された。以上の結果を合わせて考えると、ユーグレノゾア生物群の進化過程で、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の共通祖先において最初に解糖系酵素のペルオキシソーム移行が起こり、他の代謝関連酵素はそれに引き続いて移行したと考えられる。特に核酸合成関連酵素についてはキネトプラスチダ類の分岐後に特異的に局在変更が起きたことが示唆される。

## E. 結論

本研究から、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の共通祖先において、解糖系酵素のペルオキシソーム移行が起きたことが強く示唆された。一方で、本研究で明らかとなった解糖系酵素の一次構造は、生化学的解析結果を支持しない。タンパクのペルオキシソーム移行には peroxins と呼ばれる一群のタンパクが必須であり PTSs の認識、ペルオキシソーム上での足場の形成、タンパクの挿入という一連の反応に深く関与しているが、ディプロネマでは PTSs の認識機構がキネトプラスチダ類とは異なる可能性が考えられる。実際に、一部の peroxin オルソログはディプロネマゲノム上に検出できない。現在、糖代謝関連酵素群の機能発現の「場」を詳細に解析するため、現在解糖系酵素特異的抗体を作製し、免疫蛍光法等を用いた局在解析を進めている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 和文論文

#### 英文論文

1. Hashimoto M, Morales J, Fukai Y, Suzuki S, Takamiya S, Tsubouchi A, Inoue S, Inoue M, Kita K, Harada S, Tanaka A, Aoki T, Nara T. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* 417(3): 1002-1006. 2012
2. Nara T, Hashimoto M, Hirawake H, Liao CW, Fukai Y, Suzuki S, Tsubouchi A, Morales J, Takamiya S, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Fan CK, Inaoka DK, Inoue M, Tanaka A, Harada S, Kita K,

Aoki T. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 418(1): 140-143. 2012

3. Fan CK, Liao CW, Lyu SY, Sukati H, Ji DD, Cho CM, Jien JY, Huang YC, Chang PWS, Chiu WT, Nara T, Tsubouchi A, Huang YH, Tu CC, Lan SJJ, Chao JCJ. Prevalence of intestinal parasitic infections among primary school children in areas devoid of sanitation in northwestern Kingdom of Swaziland, Southern Africa. *Pathog Glob Health* 106(1): 60-62. 2012
4. Annoura T, Makiuchi T, Sariego I, Aoki T, Nara T. SUMOylation of paraflagellar rod protein, PFR1, and its stage-specific localization in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE* 7(5): art. no. e37183. 2012
5. Fan CK, Lee LW, Liao CW, Huang YC, Lee YL, Chang YT, Da Costa NDSRJ, Gil V, Chi LH, Nara T, Tsubouchi A, Akinwale OP. *Toxoplasma gondii* infection: Relationship between seroprevalence and risk factors among primary schoolchildren in the capital areas of Democratic Republic of São Tomé and Príncipe, West Africa. *Parasit Vectors* 5(1): art. no. 141. 2012
6. Minakata K, Takahashi F, Nara T, Hashimoto M, Tajima K, Murakami A, Nurwidya F, Yae S, Koizumi F, Moriyama H, Seyama K, Nishio K, Takahashi K. Hypoxia induces gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer with both mutant and wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Sci* 103(11): 1946-1954. 2012
7. Hashimoto M, Enomoto M, Morales J, Kurebayashi N, Sakurai Y, Hashimoto T, Nara T, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity, and virulence of the parasitic protist

*Trypanosoma cruzi*. Mol Microbiol, in press.

## 2. 学会発表

1. 奈良武司、ホルヘモラレス、茂木浩子、山下由莉、坪内暁子、橋本宗明．トリパノソーマの特異オルガネラ、グリコソームの起原を探る：*Diplonema papillatum* の解糖系酵素の一次構造と特徴．第 72 回日本寄生虫学会東日本支部会・第 10 回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会、前橋市、平成 24 年 10 月 12-13 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし