

機関番号：12601

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2006～2010

課題番号：18GS0314

研究課題名（和文） マラリア原虫類を中心としたオルガネラの多様なエネルギー転換機構

研究課題名（英文） Diversity of energy transducing mechanism by organella from the parasites such as *Plasmodium*

研究代表者

北 潔 (KITA KIYOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90134444

研究成果の概要（和文）：真核生物は細胞内に種々のオルガネラを持ち、それらの働きによって高度な生物機能を支えているが、従来のミトコンドリアや葉緑体の概念を越え、独自のDNAを含む多様なオルガネラが寄生性の生物で発見されつつある。そこで、これまでのモデル生物の研究からは想像もできなかったようなオルガネラの多様なエネルギー転換機構を解明するとともに、この機構を中心としたオルガネラ間のダイナミックな相互作用、さらにはその進化について考察するための確かな基盤を確立する事を目的として、マラリア原虫をはじめとする寄生原虫に焦点を絞って研究を進め、これまでのオルガネラの理解を大きく変える事実を見出した。

研究成果の概要（英文）：Eukaryotic cells possess organella, which are essential for the maintenance of their biological function. By the extensive studies, many new findings on the origin, reaction mechanism and interaction of energy transducing mitochondria and plastid, which are indispensable for the survival of the cells, have been reported. Recent study revealed the unique mitochondria of parasites, which adapt to the anaerobic environment in the host as well as the parasites without mitochondria. However, information on the process of their establishment, details of their physiological functions, interaction between the organella is limited.

The aim of this research project is to answer these questions and establish a base of our understanding the diversity of energy transduction in the novel organella, dynamic interaction between the organella and their evolution. In this study, by focusing on parasitic protozoas such as malaria parasite, we have found novel properties of parasite organella, which bring a new insight organella biology.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	83,700,000	25,110,000	108,810,000
2007年度	83,600,000	25,080,000	108,680,000
2008年度	79,200,000	23,760,000	102,960,000
2009年度	79,200,000	23,760,000	102,960,000
2010年度	79,200,000	23,760,000	102,960,000
総計	404,900,000	121,470,000	526,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学

キーワード：オルガネラ、寄生虫、感染症、エネルギー代謝、細胞・組織、進化

1. 研究開始当初の背景

真核生物は細胞内に種々のオルガネラを

持ち、それらの働きによって高度な生物機能を支えている。それらの中で、ミトコンドリアや葉緑体は細胞の生存、増殖に不可欠なエネルギー転換反応を担うオルガネラであり、精力的な研究が進められた結果、その起源、反応機構、相互作用に関して多くの事実が明らかになってきた。さらに低酸素環境に適応し、好気性生物とは大きく異なった寄生性生物の特殊なミトコンドリアの存在が明らかになり、ミトコンドリアを持たない真核生物まで報告されるようになってきた。また興味深い事に、年間数百万人の死者を出すマラリアの病原体であるマラリア原虫が、機能的に未分化の葉緑体（アピコプラスト）を含んでいる事実が明らかとなった。この様に従来のミトコンドリアや葉緑体の概念を越え、独自のDNAを含む多様なオルガネラが寄生性の生物で発見されつつある。しかし、その成立過程、生理機能の詳細、オルガネラ間の相互作用に関する情報はごく僅かであり、エネルギー転換機構の基本原則の解明とともにオルガネラの多様性に関する生物学的意義の解明が求められている。

2. 研究の目的

そこで本研究では上記の未知の問題を解決し、これまでのモデル生物の研究からは想像もできなかったようなオルガネラの多様なエネルギー転換機構を解明するとともに、この機構を中心としたオルガネラ間のダイナミックな相互作用、さらにはその進化について考察するための確かな基盤を確立する事を目的としている

3. 研究の方法

この研究目的を達成するため、

- (1) オルガネラ間相互作用とオルガネラの進化
- (2) オルガネラ DNA の複製と転写およびタンパク質合成系
- (3) ミトコンドリアと共通祖先を持つオルガネラ

の3課題に焦点を絞って研究を進める事とした。本研究は多様な分野の研究者が緊密な連係をとって研究を進め、これまでになかった包括的組織的研究体制を構築する事により、新しいオルガネラ像についての学問領域を創りたいと考えて行なったものである。

4. 研究成果

(1) オルガネラ間相互作用とオルガネラの進化

熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のミトコンドリアおよびアピコプラストをそれぞれ GFP で標識し、パーコールやセルソーターで分離を試みた結果、両者に強い相互作用が見られた。これに対して細

胞骨格関連の阻害剤の効果を検討したところ、両者が一部分離する事が判り、パーコールによる分離を繰り返す事により、それぞれのオルガネラのみを含む画分が得られる方法を確立する事ができた。

また、マラリア原虫のミトコンドリアゲノムの進化速度とアピコプラストの起源に関して、赤血球期では呼吸系が十分には機能していないマラリア原虫ミトコンドリアのゲノム進化速度を検討したところ、核ゲノムハウスキーピング遺伝子と同程度であり、ミトコンドリア DNA の進化速度が速い哺乳類と大きく異なることが明らかになった。

この様なマラリア原虫特徴に注目してマラリア原虫と宿主の共進化関係について調べた結果、現生マラリア原虫は2,000~4,000万年前に急速に多様化した事が判った。この多様化は、宿主動物の出現のはるか後の出来事であり、宿主転換によって引き起こされたと考えられ、宿主転換による急速な多様化（マラリアビッグバン）という新たな共進化仮説を提唱するに至った。これは、従来の「マラリア原虫は宿主と共進化してきた」とのマラリア原虫の進化観を覆すものであり、内外で注目されている。

さらに最も患者数の多い三日熱マラリア原虫 *P. vivax* に近縁のサルマラリアである *P. cynomolgi* の全ゲノム解析を行い、その比較と特徴から *P. cynomolgi* が *P. vivax* の実験モデル系となる事が明らかになった。これは原虫の培養系が確立していない三日熱マラリアの研究に大いに貢献すると考えられる。

またマラリア原虫類とそれに最も近縁な渦鞭毛藻（渦鞭毛虫）との分岐点近傍に位置づけられているパーキンススの葉緑体関連遺伝子候補群を見出し、色素体様オルガネラへの局在を明確に示した。また種々の解析の結果からパーキンススの色素体様オルガネラはDNAを持っていないと考えられた。これはDNAを持たない色素体様オルガネラの初めての例である。

(2) オルガネラ DNA の複製と転写およびタンパク質合成系

モデル生物である真正粘菌の情報を用いてマラリア原虫オルガネラの核様体タンパク質の網羅的解析を進めた。その中でアピコプラストの核様体タンパク質 PfHU が原虫の増殖に必須である事を見出し、抗体を用いて局在の決定し、組換えタンパク質を用いてアピコプラスト DNA との結合様式、また欠損変異株を用いた大腸菌での機能的相補を明らかにした。

さらにマラリアのデータベース上で同定されたミトコンドリアのDNAポリメラーゼ候補について、GFPによる局在解析をおこなっ

たところ、実際にミトコンドリアに輸送される事が判った。この DNA ポリメラーゼは動物や菌類のミトコンドリアで働く DNA ポリメラーゼよりも、植物で最近報告された DNA ポリメラーゼ I 様型に類似していた。また、他のミトコンドリアの DNA ポリメラーゼに存在する活性である 3' -5' exonuclease ドメインがないという特徴を持っていた。コムギ胚の系を用いたセルフリーのタンパク質合成系によって DNA 合成活性を持つ組換え酵素を得て解析した結果、通常の DNA ポリメラーゼが Mg²⁺ 要求性であるのに対して、マラリア原虫の本酵素は鉄要求性であった。この金属要求性は DNA ポリメラーゼについて初めての報告である。

またマラリア原虫に最も近縁な渦鞭毛藻との分岐点近傍にあるパーキンススのミトコンドリア遺伝子の翻訳において読み枠をずらす ribosomal frameshift が全ての AGG と CCC コドンにおいて起こっている事を明らかにした。この様な大規模な ribosomal frameshift はこれまで報告がない。

マラリア原虫ミトコンドリア内で働くリボソームは、リボソーム RNA (rRNA) が著しく断片化、縮小化した形でミトコンドリアゲノムにコードされ、それらが断片化された転写物のままで機能していると考えられている。このような特異な rRNA を含むリボソームの全貌を明らかにするために、エピトープタグを持つミトコンドリアリボソームタンパク質を発現する組換え原虫の作成を試み、タグ付きタンパク質を発現する原虫を得た。この系の確立はこの新奇なタンパク質合成系の今後の研究にとって極めて大きな意味を持っている。

(3) ミトコンドリアと共通祖先を持つオルガネラ

ミトコンドリア機能の多様化と進化を理解する事を目的として、代表的嫌気性原虫赤痢アメーバを用いてミトコンドリア関連オルガネラ (マイトソーム) の構成タンパク質と機能の解析を進めた。精製法を確立し、得られたマイトソームを用いてプロテオーム解析によりマイトソームの構成タンパク質を明らかにした。この解析により 90 以上の新規タンパク質がマイトソームに存在する事が判った。そのうち 20 について逆遺伝学的手法と生化学的方法によりマイトソームへの局在を確認した。ここで得られた最も重要な知見は、赤痢アメーバのマイトソームに硫酸活性化経路の主要酵素が偏在 (compartmentalization) していた事であった。さらに硫酸 Na の共役輸送体も局在していた。我々は同時に精製したマイトソームに実際に硫酸活性化活性が存在する事、活性化された硫酸は中性リン脂質の合成に利用さ

れる事を明らかにした。以上の知見からこの新規ミトコンドリア関連オルガネラを「サルフォソーム」と命名する事を提案した。これまでミトコンドリアに硫酸活性化経路が同定された報告はなく、本研究成果はミトコンドリアの高度に分化した機能と進化に新しい知見を加えたと考えられる。以上の成果はこれら原虫の寄生適応の戦略とそれに関わるオルガネラの特異な役割を明らかにする上で重要な基盤となるものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 80 件)

① *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. Tachibana, S., Sullivan, S. A., Kawai, S., Nakamura, S., Kim, H. R., Goto, N., Arisue, N., Palacpac, N., Honma, H., Yagi, M., Tougan, T., Katakai, Y., Kaneko, O., Mita, T., Kita, K., Yasutomi, Y., Sutton, P. L., Shakhbatyan, R., Horii, T., Yasunaga, T., Barnwell, J. W., Escalante, A. A., Carlton, J. M. and Tanabe, K. (2012) **Nature Genet.** 掲載確定 (印刷中) 査読有

② 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.** 掲載確定 (印刷中) 査読有

③ Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N. M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K. and Tanabe, K. (2011) **Mitochondrion**, 11, 273-278 査読有

④ Extensive frameshift at all AGG and CCC codons in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene of *Perkinsus marinus* (Alveolata; Dinoflagellata). Masuda, I., Matsuzaki, M. and Kita, K. (2010) **Nucleic Acids Research**. 38, 6186-6194 査読有

⑤ Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T. (2009) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106, 21731-21736 査読有

⑥ The *Plasmodium* HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival. Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki,

S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., Kita, K., Sato, S. (2009) **FEBS Lett.** 583, 1446-1450 査読有

⑦ Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) **J. Biol. Chem.** 284, 7255-7263 査読有

⑧ Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita, K. (2009) **J. Biochem.** 145, 229-237 査読有

⑨ Big bang in the evolution of extant malaria parasites. T. Hayakawa, R. Culleton, H. Otani, T. Horii, and K. Tanabe (2008) **Mol. Biol. Evol.** 25, 2233-2239 査読有

⑩ A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. Matsuzaki M., Kuroiwa H., Kuroiwa T., Kita, K. and Nozaki H. (2008) **Mol. Biol. Evolution** 25, 1167-1179 査読有

[学会発表] (計 32 件)

① Kita, Kiyoshi 「The different roles of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages and insect stage of *Plasmodium* studied by gene targeting of the Fp subunit」Molecular Approaches to Malaria February, 22, 2012 The Mantra Erskine Beach Resort, Lorne (Australia)

② Kita, Kiyoshi 「The roles of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase/quinol-fumarate reductase) of *Plasmodium* studied by gene targeting of the Fp subunit」5th Eijkman International Symposium, November 8, 2011 Hotel Borobudur, Jakarta (Indonesia)

③ 北 潔 「寄生虫ミトコンドリアの多様性：薬剤標的として」第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 21 日、京都国際会館、京都府

④ 増田 功、松崎素道、北 潔 「寄生性渦鞭毛藻類 *Perkinsus* のミトコンドリアにおける ribosomal frameshift を伴う遺伝子発現系」第 82 回日本生化学会大会、平成 21 年 10 月 23 日、神戸ポートアイランド、兵庫県

⑤ 日野明紀菜、平井誠、田中健、松岡裕之、北 潔 「マラリア原虫コハク酸-ユビキノン還元 (複合体 II) の遺伝子破壊による表現型解析」第 78 回日本寄生虫学会大会、平成 21 年 3 月 27 日、法政大学 市ヶ谷キャンパス 外濠校舎、東京都

[図書] (計 2 件)

① 原田倫世、北 潔 「クリプトスポリジウム」感染症事典 (2012) オーム社 pp. 478-481

② 山内一也、北 潔 「眠り病は眠らない」岩波科学ライブラリー (2008) 岩波書店 pp. 83-97

[その他]

ホームページ

http://www.sih.m.u-tokyo.ac.jp/chem_top-J.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北 潔 (KITA KIYOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90134444

(2) 研究分担者

田辺 和祐 (TANABE KAZUYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・招へい教授

研究者番号：40047410

野崎 智義 (NOZAKI TOMOYOSHI)

国立感染症研究所・寄生動物部・部長 (研究職)

研究者番号：60198588

渡邊 洋一 (WATANABE YOH-ICHI)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90323568

佐々木 成江 (SASAKI NARIE)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20359699

(3) 連携研究者

なし