

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460504

研究課題名(和文) 蠕虫フマル酸還元酵素の反応機構解析と選択的阻害剤の探索

研究課題名(英文) Reaction mechanism analysis and inhibitor screening of helminthic fumarate quinone reductase

研究代表者

坂元 君年 (SAKAMOTO, Kimitoshi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50361465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エキノкокスのミトコンドリア呼吸鎖複合体II、I_pサブユニットのキノン結合部位に近い[3Fe-4S]クラスターの近傍にエキノкокス特異的なアミノ酸変異、Ala→Pheを光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum*に見出したため、細菌でこのアミノ酸に変異を導入した。*R. rubrum*ではPhe→Ala、*Rhodobacter capsulatus*ではAla→Pheの変異を導入し、活性を評価した。結果的に本来のアミノ酸から変異を導入することにより、キノール-フマル酸還元活性が上昇し、コハク酸-キノン還元活性には大きな変化が見られなかった。この位置のアミノ酸に活性調節能は確かに存在する。

研究成果の概要(英文)：Echinococcus mitochondrial respiratory complex II contain unusual amino acid at very conserved site, which was Phe instead of common Ala. Same substitution was also found in bacteria *Rhodospirillum rubrum*. To assess the influence of this amino acid on catalysis, mutation Ala to Phe and Phe to Ala was introduced into the complex II of *Rhodobacter capsulatus* and *R. rubrum*, respectively. As a result, this mutation lead to enhancement of Quinol-Fumarate reductase activities and not much change in Succinate-Quinone reductase activities. This amino acid has some role on activity adjustment.

研究分野：寄生虫学

キーワード：蠕虫 ミトコンドリア コハク酸脱水素酵素 ロドキノン ミトコンドリア呼吸鎖

1. 研究開始当初の背景

(1) 蠕虫、特に腸内寄生性蠕虫が低酸素環境に適応していることは、その生活環、生息環境から容易に想像できるものであった。一般にミトコンドリア電子伝達系は酸素を用いてエネルギー産生をするシステムであり、低酸素適応とは相反する現象と言える。そして現在ではこれらの蠕虫において酸素を利用しない**嫌気的ミトコンドリア呼吸鎖**が機能していることが、主として**ブタ回虫をモデルとして用いた生化学的・分子生物学的研究によって明らかにされてきた**(Kita *et al.* Electron-transfer complexes in *Ascaris mitochondria* 2002 *Adv. Parasitol.* 51, 95-131)。嫌気的呼吸鎖の要であるミトコンドリア呼吸鎖複合体IIのブタ回虫生活環における酸素分圧の変化に伴う変遷については申請者も研究に参加し、研究を進展させてきた(Iwata *et al.* Change of subunit composition of mitochondrial complex II in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host 2008 *Parasitol. Int.* 57, 54-61)。一方で、ブタ回虫で得られた嫌気的呼吸鎖の特性が寄生性線虫に限定せず、蠕虫一般に適用出来るかどうかの情報はこれまではまったく無かった。そこで、申請者は実際に駆虫薬の求められているエキノコックスについて嫌気的呼吸鎖の関与を調べるために北海道大学・獣医学部、北海道立衛生研究所との共同研究を開始し、エキノコックス原頭節からミトコンドリアを調製し呼吸鎖の解析を行った(Matsumoto *et al.* Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis 2008 *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 164-170)。その結果、嫌気的呼吸鎖というシステムとしてはブタ回虫ミトコンドリアと同じ NADH-フマル酸還元系であることが分かったが、**酵素活性や阻害剤感受性に関してブタ回虫が蠕虫一般へのモデルとしては万能ではない**ことも同時に明らかになった。

(2) この結果を基に、エキノコックスの複合体IIの四つのサブユニットに加え、複合体形成に必要と考えられる二つのアッセムブリーファクターの遺伝子クローニングを完了させた。回虫を含む、他のミトコンドリア複

合体IIの配列と比較から、**エキノコックスに極めて特異的なアミノ酸置換 Ala Phe を見出した**。このアミノ酸置換は酵素内電子移動経路の一部である鉄-硫黄クラスターを持つサブユニット、Ipサブユニットの最もキノ結合部位に近い[3Fe-4S]クラスターの近傍に位置する。酸化還元中心の近くでアミノ酸の疎水性が変化することは酸化還元電位に影響し得る。さらにエキノコックス同様にロドキノンを利用する紅色光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* においても同じアミノ酸置換が見られることから、このアミノ酸が複合体IIの反応方向の制御に関わっている可能性が高い。またエキノコックス複合体IIの**発現系への応用の準備**として、複合体構造を維持した状態で行うNative電気泳動によりサンプル量の少ないエキノコックスミトコンドリアから複合体IIを精製した。**構成サブユニット四つすべてのN末端アミノ酸配列が決定した**。このアミノ酸配列よりミトコンドリア移行シグナルの位置が分かり、成熟タンパク質部分のみの発現計画を立てることが出来た。

2. 研究の目的

(1) 本研究は蠕虫ミトコンドリア呼吸鎖複合体IIであるキノールフマル酸還元酵素(Quinol Fumarate Reductase, QFR)の反応方向制御機構の解明が最終的な目的であり、その基盤となるエキノコックスミトコンドリア呼吸鎖 QFR のバクテリア発現系構築を目指している。

(2) アルファプロテオバクテリアから複合体IIがQFR反応の逆反応であるコハク酸脱水素酵素(Succinate Quinone Reductase, SQR)活性に大きく偏った *Rhodobacter capsulatus* の複合体IIとQFR活性の高い *Rhodospirillum rubrum* の複合体IIを選択し、それぞれに変異を導入することで、反応方向への影響を調べる。

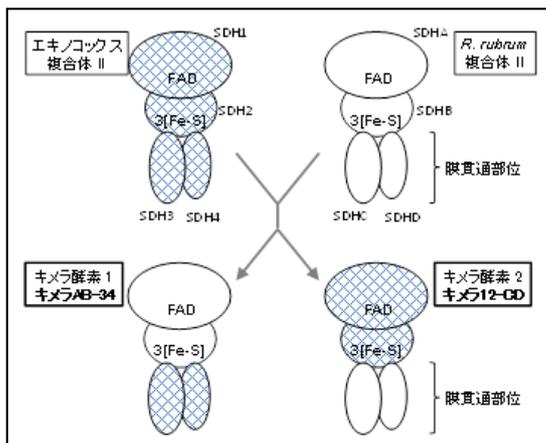
(3) 複合体IIの親水性部位と疎水性部位の由来が異なるようなエキノコックスと細菌複合体IIのキメラ酵素を作製する。この過程で二つのアッセムブリーファクターが親水性部位または疎水性部位のどちらと相互作用するかを特定する。

(4) この発現系を利用してエキノコックス選択的な阻害剤のスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

(1) エキノコックス複合体 II に特異的な Ala→Phe のアミノ酸変異を *R. capsulatus* 複合体 II に導入し、*R. capsulatus* および *R. rubrum* で発現させた。逆に、エキノコックスと同じく当該アミノ酸が Phe である *R. rubrum* の複合体 II では Phe→Ala の変異を導入し、同じく *R. capsulatus* および *R. rubrum* で発現させた。SQR 活性は *R. capsulatus* および *R. rubrum* で、QFR 活性は *R. rubrum* にて NADH-フマル酸還元活性として評価し、このアミノ酸が反応方向、触媒効率にどの程度寄与するかを調べた。

(2) エキノコックス複合体 II そのものの発現を目指した発現用プラスミドを構築した。また、発現に問題がある場合に備え、複合体 II の親水性部位と疎水性部位の片方がエキノコックス由来、もう一方が *R. rubrum* 由来のキメラ酵素の発現を目指した。これらの発現が成功した場合、アッセムリーファクターを一つずつ除くことで、どの段階でこれが機能しているかを調べるツールとなる。



4. 研究成果

(1) *R. capsulatus* および *R. rubrum* の複合体 II にそれぞれ変異を導入し、双方を宿主とした発現系を構築した。宿主と複合体 II 遺伝子の由来が異なる、異種発現系では発現量の低下による活性の低下は見られた。同種発現系では変異による SQR 活性の低下は顕著ではなかった。特に、*R. rubrum* の Phe→Ala ではほとんど活性の低下はなく、*R. capsulatus* の Ala→Phe で半分以下の活性になったものの、変異による活性低下としては大きな変化とは言えない結果であった。QFR 活性の代用で NADH-フマル酸還元活性で評価したところ、

R. capsulatus の野生型で、活性は高くはないとは言え、十分に機能している活性が検出された。注目すべき点は、どちらの細菌由来の酵素であっても、変異を導入することによって NADH-フマル酸還元活性が上昇したことである。結果的に、SQR と QFR の反応方向への影響は特定のアミノ酸がどちらかを強めるというものではなく、[3Fe-4S]クラスター近傍の変異が活性の方向性に影響を与えることだけが明らかになった。どちらの場合も野生型から変異型になることで SQR 活性はあまり低下せず、QFR 活性が大きく上昇した。このことは、どちらの酵素でも野生型は QFR 活性が抑制された状態に調節されたものだ と解釈できる。QFR 活性の高い酵素では十分はフマル酸の供給が無い場合に活性酸素種の発生源となるため、このリスクが低減された酵素であることが分かった。

(2) エキノコックス複合体 II およびエキノコックスのサブユニットを含むキメラ酵素の発現プラスミドを複数構築した。エキノコックス複合体 II のサブユニットとアッセムリーファクターをコードする遺伝子は全て人工遺伝子を用い、コドン頻度を *R. rubrum* に最適化した。これらを *R. rubrum* および *R. capsulatus* を宿主として発現を試みたが、いずれの組み合わせにおいても機能的な発現には至らなかった。研究が進む中で、アッセムリーファクターが 2 種類からさらに 2 種類追加されたため、これらが不足したことで機能的な発現に至らなかった可能性がある。また、複数の遺伝子でオペロン構造を作り、それぞれの細菌の複合体 II のプロモーター領域に結合させたが、これがオペロンとして機能しなかった可能性もある。改善策としては Fp サブユニットや Ip サブユニットのような大きな遺伝子にはそれぞれにプロモーターを付し、確実な発現を担保することが考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Inaoka DK., Iida M., Tabuchi T., Honma T., Lee N., Hashimoto S., Matsuoka S., Kuranaga T., Sato K., Shiba T., Sakamoto K.

Balogun EO., Suzuki S., Nara T., Rocha JR., Montanari CA., Tanaka A., Inoue M., Kita K., Harada S.

"The Open Form Inducer Approach for Structure-Based Drug Design."

PLoS One 11 (2016) e0167078

査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0167078

- (2) Shiobara Y., Harada C., Shiota T., Sakamoto K., Kita K., Tanaka S., Tabata K., Sekie K., Yamamoto Y, Sugiyama T.

"Knockdown of the coenzyme Q synthesis gene *Smed-dlp1* affects planarian regeneration and tissue homeostasis."

Redox Biology 6 (2015) 599-606

査読有

DOI: 10.1016/j.redox.2015.10.004

- (3) Sonoki T., Morooka M., Sakamoto K., Otsuka Y., Nakamura M, Jellison J, Goodell B.

"Enhancement of protocatechuate decarboxylase activity for the effective production of muconate from lignin-related aromatic compounds."

Journal of Biotechnology 192 (2014) 71-77

査読有

DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.10.027

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 鎌田紗綾・坂元君年： ユビキノンおよびロドキノンの機能研究材料としてのプラナリア. 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 9 月 26 日. 東北大学(仙台市)
- (2) 坂元君年・佐々木智子・Fevzi Daldal : *Rhodobacter capsulatus* 由来 *bd* キノール酸化酵素の解析. 日本生化学会東北支部第 82 回例会 2016 年 5 月 21 日. 弘前大学(弘前市)
- (3) 前多晴香・Fevzi Daldal・坂元君年： アルファプロテオバクテリア綱の細菌が持つコハク酸脱水素酵素の鉄硫黄クラスター近傍アミノ酸変異による活性制御の解析. 日本農芸化学会 2016 年大会 2016 年 3 月 30 日. 札幌コンベンションセンター(札幌市)

- (4) 室川聡大・櫻田拓也・坂元君年： 淡水生プラナリアからのミトコンドリア単離. 第 87 回生化学会大会 2014 年 10 月 18 日. 国立京都国際会館(京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂元 君年 (SAKAMOTO, Kimitoshi)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号：5 0 3 6 1 4 6 5