

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860275

研究課題名(和文)ピロリン酸を軸とした赤痢アメーバの嫌氣的代謝系とオルガネラ進化の原動力の解明

研究課題名(英文)Relationship between anaerobic metabolisms and organelle evolution of Entamoeba histolytica

研究代表者

千葉 洋子 (CHIBA, Yoko)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・深海・地殻内生物圏研究分野・ポストドクトラル研究員

研究者番号：70638981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、赤痢アメーバ原虫において縮退したミトコンドリア(マイトソーム)が多くの機能を失いつつも硫酸活性化経路という新たな機能を細胞質から取込んだ理由を、「ピロリン酸(PPi)代謝」をキーワードに明らかにすることを目的とした。具体的には、「複数の相対するPPi代謝が細胞内に共存するために、オルガネラ膜による代謝系の分離が起きた」という仮説の成否を検証した。さらに、赤痢アメーバのPPi代謝に重要な影響を及ぼしていると期待される遺伝子未知酵素の同定および性状解析も行った。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria, which function as the powerhouse of aerobic eukaryotic organisms, have undergone significant functional reduction and modifications under oxygen-reduced conditions, such as loss of oxygen-dependent ATP generation. Mitosomes are a highly degenerate form of mitochondria that lack the canonical functions of aerobic mitochondria. In the intestinal parasite Entamoeba, mitosomes exclusively contain enzymes for sulfate activation, which is not a typical function of mitochondria, and it remains a conundrum why Entamoeba has compartmentalized this pathway.

In this project, I proposed a hypothesis that a characteristic energy metabolism of Entamoeba was a key driving force for mitosome compartmentalization, and got data to support the hypothesis.

研究分野：代謝生化学

キーワード：オルガネラ 進化 寄生虫

1. 研究開始当初の背景

Entamoeba histolytica (以下、赤痢アメーバと呼ぶ) はヒトの腸管に寄生し赤痢アメーバ症を引き起こす原虫である。真核生物でありながら腸管という酸素濃度の低い特殊な環境で生育することを反映し、赤痢アメーバは酸素を用いた呼吸ではなく、もっぱら解糖系などを用いた発酵によりエネルギー (ATP) を産生している。そのため、一般に酸素呼吸を用いたエネルギー生産工場として働くミトコンドリアが、赤痢アメーバではマイトソームと呼ばれる細胞小器官に縮退している。赤痢アメーバのマイトソームは本来ミトコンドリアが有する TCA 回路・電子伝達系・酸化経路などの機能を失っている一方で、他の真核生物では細胞質に存在する硫酸活性化経路を有する (図 1)。これまでの研究からマイトソームおよび硫酸活性化経路は赤痢アメーバの生存に必須であること、また本経路で活性化された硫酸は細胞質において脂質に受け渡されることが明らかにされている。しかし、なぜ赤痢アメーバのマイトソームはミトコンドリア本来の機能をことごとく捨てながら硫酸活性化経路という新たな機能を獲得したのかについては未明であった。

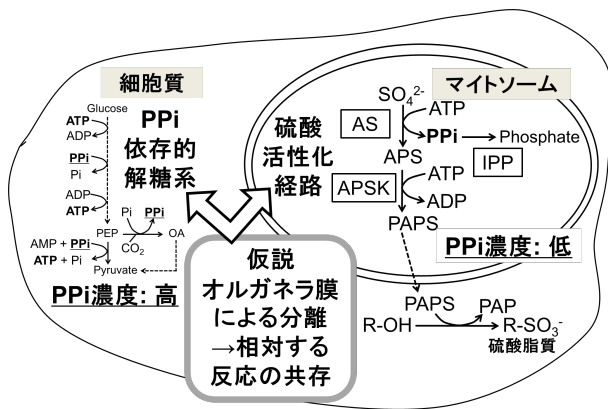


図 1 : 赤痢アメーバにおいて PPi が関与する主な反応系とその局在

APS: adenosine-5'-phosphosulfate; PAPS: 3'-phospho-APS; AS: sulfate adenylyltransferase; APSK: APS kinase; OA: oxaloacetate
AS: sulfate adenylyltransferase; APSK: APS kinase; PEP: phosphoenolpyruvate

ところで、赤痢アメーバは無機リン酸 2 分子が高エネルギーリン酸結合でつながったピロリン酸 (PPi) を必要とする特殊な解糖系を有する (図 2)。これは、赤痢アメーバが真核生物でありながら嫌気的な環境に生息し、ATP 産生を解糖系における発酵に依

しているためと考えられている。何故なら、PPi 依存型解糖系は、一般的な解糖系と比較して得られる正味の ATP 量が多いからである。PPi 依存的な解糖系を機能させるためには、比較的高い PPi 濃度が必要であると考えられる。一方、硫酸活性化経路を正の方向に強く働かせるためには、低 PPi 環境を整える必要があることが知られている。すなわち、PPi 依存型解糖系と硫酸活性化経路という 2 つの代謝は、相反する PPi 濃度を好むという特徴を有する (図 1)。実際、赤痢アメーバの細胞質には PPi を分解し、PPi 濃度を低く保つ働きを有する酵素 inorganic pyrophosphatase (IPP) が存在しないことが知られている。一方で、赤痢アメーバのマイトソーム内には IPP が存在する。すなわち、細胞質・マイトソームそれぞれにおける代謝に好ましい PPi 濃度と IPP の有無には相関関係があると思われる。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、赤痢アメーバは細胞質に存在する PPi 依存的な解糖系と低 PPi 濃度環境を必要とする硫酸活性化経路を細胞内に共存させるために、PPi 分解酵素である IPP を含む硫酸活性化経路をマイトソーム膜内に隔離した、という仮説を立てた。本研究では、この仮説の成否を検証することを第 1 の目的とした。

ところで、PPi は様々な反応の副産物として大量に生じることが知られており、IPP はその濃度をコントロールするのに重要であると考えられている。しかし、赤痢アメーバは細胞質に IPP を有さないため、IPP 以外の何かを用いて細胞内の PPi 濃度をコントロールしていると考えられる。赤痢アメーバはよく知られている ATP もしくは GTP ではなく、PPi を基質とする phosphoenolpyruvate carboxykinase 活性を有することが知られている。中央代謝酵素のひとつである PPi 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase は赤痢アメーバの細胞質において PPi 濃度調整に寄与していると期待される (図 2)。しかし、この PPi 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase をコードする遺伝子は未明であった。今後遺伝子改変の手法を用いて赤痢アメーバにおける PPi 濃度の影響やそのコントロールシステムを理解する上で、PPi 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase 遺伝子情報は必須である。また、本遺伝子情報が得られれば、赤痢アメーバにとどまらず多くの生物の代謝をより正確に理解することに貢献できる。そこで PPi 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase を同定することを第 2 の目的とした。

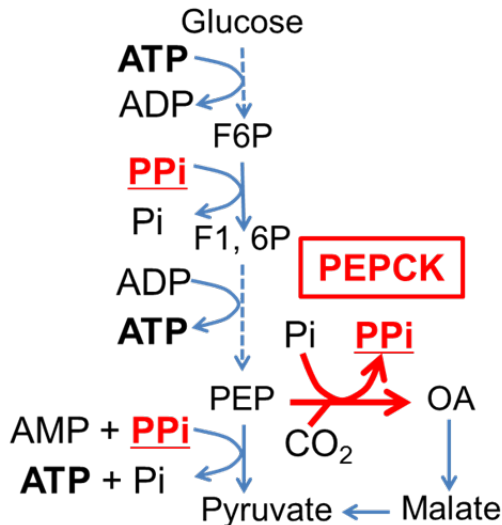


図 2 : 赤痢アメーバの中央代謝系における PPI 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) の位置づけ

3 . 研究の方法

(1) 目的 1 : 赤痢アメーバ細胞質における IPP の影響評価

赤痢アメーバの細胞質にテトラサイクリン誘導法を用いて IPP を強制発現させる実験系を確立した。そして、IPP 強制発現時の細胞生存率をトリパンブルー法にて求めた。また、細胞内の ATP, PPI, 中央代謝産物濃度の変化を観察した。これには、特定の代謝産物濃度を求めるための酵素を用いた定量法、および幅広い代謝産物を網羅的に検出する CE-MS/MS を用いたメタボローム法の両方を用いた。

(2) 目的 2 : PPI 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase の同定および性状解析

以下に示す方法で赤痢アメーバから PPI 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase タンパク質を精製し、同定した。まず、赤痢アメーバを凍結融解法を用いて破碎した。破碎した細胞の可溶画分に 30% 飽和硫酸を加え、沈殿物を除去した上清を疎水性カラム (Butyl-toyopeal) に供した。溶出画分の内、phosphoenolpyruvate carboxykinase 活性を有するものを脱塩し、陰イオン交換カラム (MonoQ) に供した。溶出画分の内、活性を有するものをさらにゲルろ過カラム (Superdex 200) に供し、精製した。精製されたタンパク質をプロテアーゼ処理によりペプチドに分断した後、LC-MS/MS に供して同定した。さらに同定されたタンパク質遺伝子が大腸菌にて発現・精製・活性測定を行っ

た。

さらに、本異種発現タンパク質を抗原としたポリクローナル抗体を作成した。赤痢アメーバを物理的に破碎し、細胞質画分と細胞小器官画分を遠心分離したものをものと上述の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、PPI 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase の赤痢アメーバ内における局在を確認した。

4 . 研究成果

(1) 目的 1 : 赤痢アメーバ細胞質における IPP の影響評価

細胞質において IPP を強制発現することにより、細胞が死に至ることが確認できた。また、この時赤痢アメーバ内の PPI および ATP 濃度が顕著に低下することを発見した。さらに、解糖系中間代謝産物の濃度の挙動を調べたところ、IPP の発現により PPI 依存型酵素反応が阻害されていることを示唆するデータが得られた。すなわち、提示した仮説が正しいことをサポートするデータが得られた。

(2) 目的 2 : PPI 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase の同定および性状解析

PPI 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase を赤痢アメーバから精製し、そのアミノ酸配列を決定することに成功した。同定されたタンパク質遺伝子が大腸菌にて発現し、精製したところ同活性が得られたことから、逆遺伝学的にも本タンパク質を同定することができた。赤痢アメーバを細胞質画分と細胞小器官画分に分画し、どちらに PPI 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase が存在するかウエスタンブロッティング法により確認したところ、細胞質画分に存在することが明らかになった。いわゆる普通のミトコンドリアの中には

phosphoenolpyruvate carboxykinase を有するものも存在するが、赤痢アメーバの場合は予想通り細胞質に局在しており、中央代謝産物の変換反応に加えて PPI 濃度の調整に寄与していることが予想された。

なお、遺伝子同定された PPI 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase は ATP, GTP 型 phosphoenolpyruvate carboxykinase と明確なアミノ酸配列の相同性を示さない新規な酵素であることが明らかになった。これは ATP 型と PPI 型が明確なアミノ酸配列の相同性を示す解糖系酵素の 1 種である phosphofructokinase の例とは異なる結果であった。本発見は酵素の基質特異性の進化を理解するうえで、重要な知見となる。さらに、赤痢アメーバの PPI 型

phosphoenolpyruvate carboxykinase が同定されたことで、本酵素がどのような生物に存在するか、登録されている生物のゲノム情報を用いて高度に予測することが可能になった。その結果、本酵素が赤痢アメーバ以外にも様々な単細胞性真核生物および真正細菌に存在することが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoko Chiba, Ryoma Kamikawa, Kumiko Nakada-Tsukui, Yumiko Saito-Nakano, Tomoyoshi Nozaki. Discovery of PPi-type phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in eukaryotes and bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 査読あり, 290, 2015, 23960-23970
DOI: 10.1074/jbc.M115.672907

〔学会発表〕(計 7 件)

Yoko Chiba, Takehiro Yamamoto, Ryoma Kamikawa, Mai Itoh, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Nozaki, Discovery of PPi-type phosphoenolpyruvate carboxykinase and the physiological importance. *Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism: Gordon Research Conference*, 2016.07.31-08.05, Waterville Valley, USA.

Yoko Chiba, Takehiro Yamamoto, Ryoma Kamikawa, Mai Itoh, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Nozaki, Discovery of PPi-type phosphoenolpyruvate carboxykinase and the physiological importance. *Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism: Gordon Research Seminar*, 2016.07.30-07.31, Waterville Valley, USA.

Yoko Chiba, Takehiro Yamamoto, Mai Itoh, Makoto Suematsu, Tomoyoshi Nozaki, Why is sulfate activation compartmentalized into the mitochondrion-related organelle in *Entamoeba*?, *International seminar on Amebiasis*, 2015.10.13-16, Campeche, Mexico.

Yoko Chiba, Discovery of a Novel Serine Synthetic Pathway by Reannotation of Glycolytic Enzymes, *American Society for Microbiology 115th General Meeting*, 2015.05.30-06.02, New Orleans, USA.

千葉洋子、神川龍馬、野崎智義、失われた中央代謝系ハブ酵素の発掘—「新規」PEP carboxykinase の同定とその生物間分布, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015.03.26-29

岡山大学 (岡山県岡山市)

千葉洋子、神川龍馬、津久井久美子、中野由美子、野崎智義、赤痢アメーバ原虫における新規 PEP carboxykinase の同定と性状解析, 第 84 回日本寄生虫学会年会, 2015.03.21-22, 杏林大学 (東京都三鷹市)

Yoko Chiba and Tomoyoshi Nozaki, "Discovery" of pyrophosphate-producing PEP carboxykinase from an anaerobic protist, *Entamoeba histolytica*, *Molecular Basis of Microbial One-Carbon Metabolism: Gordon Research Conference*, 2014.08.10-15, South Hadley, USA.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 洋子 (CHIBA, Yoko)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・
深海・地殻内生物圏研究分野・ポストド
クトラル研究員

研究者番号 : 70638981