

平成 22 年 2 月 1 日現在

研究種目： 特定領域研究

研究期間： 2006～2010

課題番号： 18073001

研究課題名（和文）原虫感染における含硫アミノ酸代謝の役割

研究課題名（英文）Sulfur-containing amino acid metabolism in protozoan infections

研究代表者

野崎 智義 (NOZAKI TOMOYOSHI)

国立感染症研究所・部長

研究者番号： 60198588

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・寄生虫学（衛生昆虫学を含む）

キーワード： 寄生虫；代謝学；メタボロミクス；トランスクリプトミクス

1. 研究計画の概要

含硫アミノ酸代謝はすべての生物に普遍的に存在し、多くの重要な生物反応に必須である。本研究では、寄生性原虫赤痢アメーバをモデルとして、感染における含硫アミノ酸代謝の役割を解析する。具体的には、原虫に特異的に存在している含硫アミノ酸代謝経路及び解糖経路等中心代謝が寄生と環境変化に応答してどのように機能しているかを、遺伝子の転写調節、タンパク質発現、代謝中間産物の解析を統合したアプローチにより明らかにする。初-3年度は、原虫に特異的に存在している含硫アミノ酸代謝経路とエネルギー代謝経路が寄生の過程でどのように機能しているかを、主に遺伝子のトランスクリプトーム解析、メタボローム解析により明らかにしようとした。更に、3年次にはシステイン負荷・除去により発現が大きく変化した酸化還元酵素を抽出し、詳細な生化学的検討を行い、酵素学的特徴、生理機能を解明した。

2. 研究の進捗状況

トランスクリプトーム解析では、赤痢アメーバ 9000 の全遺伝子を網羅したアリメトリクスプラットフォームのマイクロアレイを作成し、トランスクリプトーム解析を行った。病原性に係る遺伝子発現を解明することを目的として、腸管感染から分離された原虫と無菌培養されている原虫とでトランスクリプトームの比較を行ったところ、セリン代謝経路の 2 酵素、システイン生合成経路の 2 酵素、硫酸活性化回路の 1 酵素の遺伝子、メチオニン分解酵素などに大きな遺伝子発現の変動があった。これらの酵素遺伝子発現はおおむね減少していた。しかし、メチオニンガ

ンマリアーゼ 1 だけは腸管感染に伴い 10 倍以上発現が上昇していた。また、解糖経路の 5 酵素遺伝子にも発現低下が見られた。更に、含硫アミノ酸代謝に関与する酵素活性に影響を与える培養条件のスクリーニングを行い、高濃度のメチオニン並びにセリンにより含硫アミノ酸及びエネルギー代謝が調節を受けることが明らかにされた。

更に、含硫アミノ酸代謝酵素活性を変化させる様々な条件(セリンおよびメチオニン負荷)により生じる遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイを用いて明らかにした。これによりメチオニン、セリン、システインの付加によって増減する遺伝子群が特定された。特にシステイン負荷において多くの遺伝子が増減した。これらの中には多くの機能未知タンパク質が含まれていたが、同時に病原性の違いと相関する ArfA2 遺伝子が含まれていた。

また、キャピラリー電気泳動法と質量分析計を用いたメタボローム解析により、原虫の抽出液から約 150 の代謝中間体を再現性よく定量する系を確立した。これらの解析により、これまで信じられていた教科書的な赤痢アメーバの解糖経路の流れが謝りであることが示された。具体的には、グルコースの大部分がグリセロール 3 リン酸に蓄積すること、フォスフォエノールピルビン酸からのアセチル CoA の合成はピルビン酸を介さずに行われるなどの新規な知見が得られた。

また各代謝経路の各酵素のもつ代謝経路におけるそれぞれの役割を解明するために、含硫アミノ酸分解に重要な働きをするメチオニンガンマリアーゼと、硫黄同化的システイン合成において重要なセリンアセチル転移酵素の過剰発現体を作製した。今後これらの

形質転換体を用いたメタボローム解析の準備が整った。また、メチオニンガンマリアーゼの反応機構が確立されるとともに、プロドラッグトリフルオロメチオニンの作用機序が証明された。

トランスクリプトーム解析により抽出された遺伝子の機能解析を行った。フェレドキシン:NAPD還元活性、並びに、シスチン・2価鉄還元活性を有することが明らかとなった。同時にメトロニダゾールを還元し、インビボでの薬剤感受性に関与することが明らかとなった。従って本酵素は細胞のレドックス状態により厳密な調節を受け、システインや鉄の代謝に関与する酵素であることが明らかとなった。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

予定された赤痢アメーバ原虫のトランスクリプトーム解析、メタボローム解析の手法はほぼ完璧に樹立され、具体的な比較解析、経時変化の定量解析などの応用が可能となった。同時に、発現調節を受ける遺伝子の具体的な機能に関しても順調に解析が進められている。メタボローム解析に係る論文がまだ投稿・発表されていないが、4-5年次での達成が予定されている。

4. 今後の研究の推進方策

(1) メタボローム解析により、システイン枯渇によって上昇する新規分子が発見された。この新規分子の構造と生理機能の解明に向け、一部、研究の方向性をシフトする予定である。

(2) トランスクリプトーム解析、メタボローム解析により明らかとなった重要な酵素に関しては、個別の機能解析を継続し、今後の研究期間で、含硫アミノ酸代謝のネットワークの調節ポイント、調節機構の解明を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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8件)

Gilchrist, C. A., Houpt, E., Trapaidze, N., Fei, Z., Crasta, O., Asgharpour, A., Evans, C., Martino-Catt, S., Baba, D. J., Stroup, S., Hamano, S., Ehrenkauf, G., Okada, M., Singh, U., Nozaki, T., Mann, B. J., Petri, Jr., W. (2006) Impact of intestinal colonization and invasion on the *Entamoeba histolytica* transcriptome. Mol. Biochem. Parasitol. 147, 163-176.
Ali, V. and Nozaki, T. (2007) Current

therapeutics, their problems, and sulfur-containing amino acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. Clin. Microbiol. Rev. 20, 164-187.

Sato, D., Yamagata, W., Kamei, K., Nozaki, T. and Harada, S. (2006) Expression, purification, and crystallization of L-methionine γ -lyase 2 from *Entamoeba histolytica*. Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 62, 1034-1036.

Clark, C.G., Cecilia, U., Alsmark, M., Hofer, M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P. G., Samuelson, J., Noel, C. J., Hirt, R. P., Embley, T. M., Gilchrist, C. A., Mann, B. J., Singh, U., Ackers, J. P., Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillen, N., Duchene, M., Nozaki, T., and Hall, N. (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. Adv. Parasitol. 65, 51-190.

Sato, D., Yamagata, W., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Kinetic characterization of methionine γ -lyases from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* against physiological substrates and trifluoromethionine, a promising lead compound against amoebiasis. FEBS J. 275, 548-560.

Sato, D., Karaki, T., Shimizu, A., Kamei, K., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Crystallization and preliminary X-ray analysis of L-methionine γ -lyase 1 from *Entamoeba histolytica*. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. 64, 697-699, 2008.

Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2009) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. Mol. Biochem. Parasitol. 163, 39-47.

Wong, E., Okhonin, V., Berezovski, M., Nozaki, T., Alexandrov, K., and Krylov, S. (2008) “Inject-mix-react-separate-and-quantitate” method for High-throughput screening of enzyme Inhibitors. J. Am. Chem. Soc. 130, 11862-11863.

〔学会発表〕(計8件)

- 清水 颯、唐木 剛、佐藤 暖、亀井加恵子、
野崎智義、原田繁春 (2008) 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* 由来メチオニンγ-リアーゼのX線結晶構造解析 第8回日本蛋白質科学会年会、平成20年2008年6月10日-12日、東京
- 佐藤 暖、山形 渉、唐木 剛、原田繁春、
野崎智義 (2008) 腸管寄生性アメーバ原虫のメチオニンγ-リアーゼと薬剤リード化合物の反応機構の解明 日本ビタミン学会第60回大会 平成20年6月13-14日、仙台
- Husein, A., Jeelani, G., Bilal, A. S., Sato, D., Mi-ichi, F., Hishiki, T., Gilchrist, C. A., Suematsu, M., Petri, Jr., W. A., and Nozaki, T. (2008) Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept 7-11, 2008.
- Sato, D., Yamagata, W., Karaki, T., Shimizu, A., Harada, S., and Nozaki, T. (2008) Characterization of methionine gamma-lyases from enteric protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, as a potential drug target against amoebiasis". The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Sept 7-11, 2008.
- 佐藤暖、Afzal Husain, 曾我朋義、末松誠、
野崎智義 (2008) 寄生性原虫の含硫アミノ酸代謝の重要性—メタボローム解析からのアプローチ—第3回メタボロームシンポジウム—メタボロミクスが解き明かす生命のシステム— 平成20年10月30日—11月1日。
- 佐藤 暖、唐木 剛、原田繁春、柴田哲男、
融 健、野崎智義 :「含硫アミノ酸 分解酵素・メチオニン γ-リアーゼを標的とした新規抗赤痢アメーバ薬の開発」 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会) 平成20年12月9-13日、神戸
- 唐木剛、清水颯、佐藤暖、亀井加恵子、原田繁春、野崎智義 (2008) 硫黄含有アミノ酸生合成・分解経路を標的とする抗赤痢アメーバ薬の開発—メチオニンγ-リアーゼの立体構造と阻害剤の結合様式— 第7回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 松山、平成20年10月10-11日
- Nozaki, T., Furukawa, A., Jeelani, G., Sato, D., Karaki, T., and Harada, S.

(2009) Role of sulfur-containing amino acid metabolism: characterization of two isotopes of methionine gamma-lyase in *Entamoeba histolytica*. XVI Seminario Sobre Amibiasis and EMBO Workshop. Amoebiasis: Molecular Approaches in an Important but Neglected Disease. Guanajuato, Mexico. February 24-28, 2009

〔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〕