

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073004

研究課題名（和文） 蠕虫の増殖と病原性

研究課題名（英文） Growth and pathogenicity of Helminthes

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

研究分野：医学

科研費の分科・細目：寄生虫学

キーワード：感染症、酵素、進化、発現制御、発生・分化、低酸素適応、ミトコンドリア、フマル酸還元酵素

1. 研究計画の概要

我々は回虫やトリパノソーマなどの寄生虫と宿主であるヒトのミトコンドリアを用いて酸素適応機構の解明を目的として研究を進めているが、中でも嫌気的な小腸に生息する回虫成虫で見出した NADH-フマル酸還元系は多くの寄生虫に存在し、宿主体内の環境で中心的な役割を果たしている事が明らかになった。この系は複合体 I (NADH-ユビキノ還元酵素)、ロドキノンおよび複合体 II (ロドキノール-フマル酸還元酵素：RQFR) の 3 成分から構成され、NADH からフマル酸への電子伝達を触媒している。その生理的意義は低酸素下でも複合体 I の共役部位を駆動する事により ATP を合成できる点にある。一方、発生に酸素を必要とする幼虫では哺乳類型の酸化リン酸化によって ATP を合成している事も判ってきた。そこで本研究では NADH-フマル酸還元系の分子構築とその生理機能の特徴を明らかにし、生活環におけるダイナミックな呼吸系の変動の制御機構を解析する目的で研究を進めている。実際には以下にあげる 3 項目に焦点を絞って研究を進めている。

- (1) 受精卵、幼虫および成虫における複数の多様な複合体 II の分子構築と電子伝達機能
- (2) キノン類と呼吸酵素の特異的相互作用
- (3) 宿主体内移行を含む、全生活環におけるミトコンドリア機能の変動とその調節機構

2. 研究の進捗状況

- (1) 受精卵、幼虫および成虫における複数の多様な複合体 II の分子構築と電子

伝達機能

生理的条件下でフマル酸還元酵素として機能する成虫複合体 II に関しては、結晶化条件がほぼ確立しつつあった事から高解像度の結晶解析を試みた。界面活性剤や可溶性条件、また沈澱剤を検討した結果、2.7 Å の解像度を与える結晶を得た。

さらに成虫複合体 II が活性酸素種を生成する事を見出して解析した結果、基質の酸化還元に関与する FAD およびキノ結合部位の二つの部位から還元力が酸素に伝達されている事が判った。一方、コハク酸酸化を触媒する幼虫型複合体 II は成虫型酵素に比較して活性酸素種の発存量は極めて少なかった。

また、これら複数の複合体 II の生化学的性質の相違点を明確にする目的で、コムギ胚の系を用いた試験管内での発現系の確立を試みた。その第一段階として成虫酵素の各サブユニットを発現した結果、全てのサブユニットがペプチドとして合成されたが、興味深い事に疎水性のアンカーサブユニットは共存させたりポソームに局在した。

(2) キノン類と呼吸酵素の特異的相互作用

結晶化条件が確立した成虫酵素に関し、阻害剤との共結晶解析を試みた。その結果、アトベニンおよびフルトラニルがロドキノン結合部位に結合している事が明らかになった。また、低濃度で阻害するアトベニンは多くの水素結合を示し、特異性の高いフルトラニルは回虫特異的結合部位を形成している事が判った。

- (3) 宿主体内移行を含む、全生活環におけるミトコンドリア機能の変動とその調節機構

これまでに研究から好気下の受精卵の第3期幼虫までの発生において複合体 II のサブユニット組成が大きく変化する事が判った。そこで宿主体内移行を含む、全生活環におけるミトコンドリア機能の変動とその調節機構を調べる目的で実験的宿主として、ウサギに感染幼虫包蔵卵を経口摂取させ、体内移行中の複合体 II のサブユニット組成および酵素としての性質の変動を調べた結果、肺のステージでは、キメラ型の存在を示唆する結果が得られた。さらに実験的宿主として、本来の宿主であるブタを用いて感染幼虫包蔵卵を経口摂取させ、体内移行中の複合体 II のサブユニット組成および酵素としての性質の変動を調べた結果、肺のステージでは、ウサギと同様にキメラ型が観察されたが、サイズは大きく異なり宿主・寄生体相互作用の種特異性が明確になった。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

研究を進めている(1)受精卵、幼虫および成虫における複数の多様な複合体 II の分子構築と電子伝達機能、(2)キノン類と呼吸酵素の特異的相互作用、(3)宿主体内移行を含む、全生活環におけるミトコンドリア機能の変動とその調節機構の3項目全てに関し、それぞれ複合体 II の酵素学的解析、低分子伝達体との相互作用、さらに体内移行中の幼虫を用いた解析が計画に則して進んでおり、これまでの研究はおおむね順調に進展していると考えられる。さらにミトコンドリアの嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系が回虫ばかりでなくエキノコックスの様な条虫類でもその生存に必要な不可欠である事が明らかになった事は高く評価できる。実際に下記の文献で報告した様に、特異的に寄生蠕虫の複合体 I を阻害するキナゾリン誘導体がエキノコックスの幼虫を刹滅するとの結果は現在効果的な治療薬のないエキノコックス症の治療に大きな前進を与えるものであり、当初の計画以上に進んでいる部分もある。

4. 今後の研究の推進方策

成虫型複合体 II と特異的に結合する阻害剤に関してはさらに構造活性相関を解析し、より協力で特異的な化合物を見出したい。また NADH-フマル酸還元系で重要な役割を果たしているロドキノンの生合成系を明らかにし、好氣的条件下で合成されるユビキノンの生合成の調節機構を明らかにして行きたい。さらに体内移行中の幼虫における呼吸系の変動に関しては、肺のステージに加え、肝臓、また小腸における young adult 型の酵素に関しても本来の宿主であるブタを用いた感染実験を行い、全生活環を通じた変動とそ

の発現調節機構を明らかにする。特に最近回虫で見出した HIF (Hypoxia inducible factor) は哺乳類などで低酸素下での適応に関わる転写因子として知られており、呼吸系酵素の発現制御への関与の詳細を解析したい。

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13件)

Change of subunit composition of mitochondrial complex II (Succinate-ubiquinone reductase/Quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host. Iwata F., Shinjyo N., Amino H., Sakamoto K., Islam M. K., Tsuji N. and Kita K. (2008) Parasitol. Int. 57, 54-61 査読有

Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis. Matsumoto J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., Kita K. and Oku Y. (2008) Antimicrob. Agents. Chemother. 52, 164-170 査読有

Screening of detergents for solubilization, purification and crystallization of membrane proteins: a case study on succinate:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. Shimizu, H., Nihei, C., Inaoka, D. K., Mogi, T., Kita, K. and Harada, S. (2008) Acta Crystallographica F64, 858-862 査読有

[学会発表](計5件)

北 潔 寄生虫の生活環におけるダイナミックなエネルギー代謝の変動 第81回日本生化学会大会第・31回日本分子生物学会年会 合同大会平成20年12月

Madhavi Paranagama, Kimitoshi Sakamoto, Kiyoshi Kita *Ascaris suum* quinol fumarate reductase can produce high amount of reactive oxygen species. 第81回日本生化学会大会第・31回日本分子生物学会年会 合同大会平成20年12月

[図書](計1件)

[その他]

ホームページ

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