

機関番号：12601

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

研究成果の概要（和文）：

寄生虫は真核生物における適応現象の研究を進めるうえで極めて優れた研究対象であり、特にエネルギー転換系の様な全生物に共通の代謝系の適応や進化、また基本的な反応機構を理解するうえで最適な系のひとつと考えられる。回虫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低酸素適応機構の解明を目的として研究を進めた結果、小腸に生息する回虫成虫で見出した NADH-フマル酸還元系（フマル酸呼吸系）は多くの寄生虫に存在し、宿主体内の環境で重要な役割を果している事が明らかになった。さらに興味深い事に、特殊な環境下ではヒトのミトコンドリアでもフマル酸呼吸が機能している事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Parasites are good model system for the study of biological adaptation in eukaryotic organisms. Especially, to study the fundamental functions such as energy metabolisms common among the living beings and to understand a mechanism of the biological reactions, parasite is one of the best systems.

By the study using *Ascaris suum* which resides in the host small intestine where oxygen tension is quite low, we found that NADH-fumarate reductase system (Fumarate respiration) plays an important role in the adaptation to hypoxic environment. Further analysis revealed that fumarate respiration functions in the host human cells in hypoxic condition as well as other helminthes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	18,000,000	0	18,000,000
2007年度	18,000,000	0	18,000,000
2008年度	28,672,725	0	28,672,725
2009年度	18,000,000	0	18,000,000
2010年度	18,000,000	0	18,000,000
総計	100,672,725	0	100,672,725

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：

感染症、寄生適応、低酸素適応、ミトコンドリア、フマル酸呼吸、複合体 II、薬剤開発

1. 研究開始当初の背景

寄生虫は真核生物における適応現象の研究を進めるうえで極めて優れた研究対象であり、特にエネルギー転換系の様な全生物に共通の代謝系の適応や進化、また基本的な反応機構を理解するうえで最適な系のひとつと考えられる。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きたが、中でも低酸素環境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(図1)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-ユビキノン還元酵素)、ロドキノンおよび複合体 II (ロドキノーラー-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。

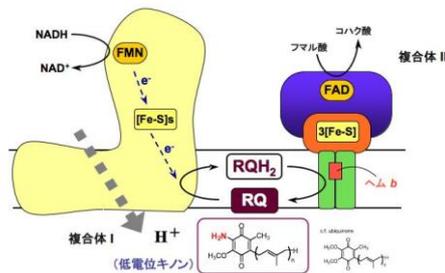


図1 回虫成虫のNADH-フマル酸還元系

2. 研究の目的

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、

- (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点に焦点を絞って研究を行い、最終的に、この代謝系とその適応制御が蠕虫全般にわたる普遍的な戦略である事を明確にする事

を目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成する目的で、主に寄生性線虫であるブタ回虫を用いて研究を行った。生活環におけるミトコンドリア呼吸鎖の変動の解析には非固有宿主であるウサギおよび固有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、肺のステージ、また小腸において成虫へと成長する直前の段階であるヤングアダルトを回収し、生化学的解析を行った。また同時に自由生活生の線虫である *Caenorhabditis elegans* を低酸素誘導因子の研究における対照として用いた。さらに寄生蠕虫におけるフマル酸呼吸の普遍性を調べる目的でエキノコックスの幼虫を用いてそのエネルギー代謝の特徴と呼吸鎖の特異的阻害剤を探索した。

4. 研究成果

- (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

複合体 II は細菌では細胞質膜に、また真核生物ではミトコンドリア内膜に局在しており、基本的に4つのポリペプチドから構成されている(図2)。分子量約70 kDaの最も大きいサイズのサブユニット(Fp)は補欠分子族としてFADを含み、これと分子量約30 kDaで3種の異なるタイプの鉄-イオウクラスターを含むIpサブユニットから比較的親水性の触媒部位が形成されている。この触媒部位はSQRではコハク酸からフェナジメトスルフェート(PMS)など水溶性の電子受容体への、逆にQFRでは水溶性の電子供与体である還元型メチルビオロゲンからフマル酸への電子伝達を担っている。この触媒部位が膜に安定に局在するためには2つの小さな疎水性のサブユニットが必要であり、多くの生物種の酵素でヘムbを含むことからシトクロムbサブユニット(CybLおよびCybS)と呼ばれている。シトクロムbは複合体IIとユビキノンやロドキノンなど膜中に存在する疎水性の電子伝達成分との電子の受け渡しに必要であり、複合体としてはシトクロムbが膜アンカーとして膜内に局在し触媒部位はマトリックス側に突出した形をとっている。

大腸菌など細菌においては好氣的に培養すると *sdh* オペロンにコードされるSQRが、また嫌氣的な条件下では *frd* オペロンにコードされるQFRが発現し、環境に適応してエネルギー代謝系を維持する。両者はサブユニット構造や各ペプチドのアミノ酸配列は類似しているが、対応するサブユニットは全て

異なっており、異なった独立の酵素として存在する。我々は感染幼虫包蔵卵中の第3期幼虫および成虫から複合体 II を精製し、酵素タンパク質および遺伝子レベルでの解析を行い、これらが二つの独立した酵素であることを明らかにした。そして Fp と CybS は幼虫と成虫で異なる一方、Ip と CybS は両者で同一のサブユニットとなっている事が判った。

生理的条件下でフマル酸還元酵素として機能する成虫型複合体 II に関しては、立体構造を明らかにする目的で界面活性剤や可溶化条件、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。その結果、[還元型ロドキノン]-11.6 Å-[3Fe-4S]-11.7 Å-[4Fe-4S]-11.6 Å-[2Fe-2S]-16.2 Å-[FAD] と補欠分子族が複合体中に配置し、還元型ロドキノンから FAD への電子伝達が容易に進行し、最終的にフマル酸を還元してコハク酸を生成する構造になっている事が明らかになった。

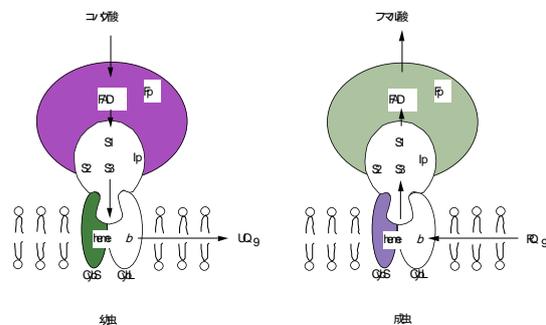


図2 回虫ミトコンドリアの2種の複合体 II

またロドキノンが Ip、CybL および CybS から構成される疎水性のポケットに結合している事が判ったが、これに関しては阻害剤との相互作用も含め次項で報告する。

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解析した結果、基質の酸化還元に関与する FAD およびキノン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生量は極めて少なかった。

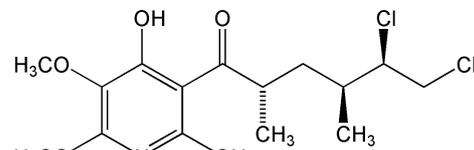
また、これら複数の複合体 II の生化学的性質の相違点を明確にする目的で、コムギ胚の系を用いた試験管内での発現系の確立を試みた。その第一段階として成虫酵素の各サブユニットを発現した結果、全てのサブユニットがペプチドとして合成されたが、興味深い事に疎水性のアンカーサブユニットは共存させたりポソームに局在した。

(2) キノン類と呼吸酵素の特異的相互作用

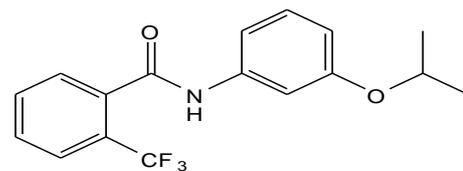
結晶化条件が確立した成虫酵素に関し、阻害剤との共結晶解析を試みた結果、アトペンニンおよびフルトラニルがロドキノン結合部

位に結合している事が明らかになった (図3)。

アトペンニンは低濃度で回虫複合体 II を阻害するが (SQR に対しては IC₅₀ は 32 nM)、哺乳類ミトコンドリアの複合体 II の活性をより強く阻害する (ウシ心筋複合体 II の SQR に対して IC₅₀ は 3.6 nM)。一方、フルトラニルはウシの酵素 (IC₅₀ は 100 μM) に対して回虫酵素を特異的に阻害するが、その IC₅₀ (180 nM) はアトペンニンに比較して高かった。そこで両者の共結晶を詳細に解析したところ、低濃度で阻害するアトペンニンは多くの水素結合で相互作用しているが、そのアミノ酸残基は生物種間で保存されており、哺乳類も回虫も同様に阻害される事が判った。一方、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た。特にフルトラニルのイソプロピル基周辺が特異性に重要な役割を果たしている事が明らかになった。



アトペンニン



フルトラニル

図3 複合体 II の阻害剤

(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

これまでの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てきた。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非固有宿主であるウサギに感染させて調べた結果、肺のステージでは、Fp は幼虫型で CybS が成虫型のキメラ型の存在を示唆する結果が得られた。すなわち複合体 II は全てのサブユニットが同時に幼虫型から成虫型に変換するのではなく、CybS に引き続き Fp と順次変換して行く事が明らかになった。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ウサギに感染させた場合より大型であった。この様に宿主・寄生体相互作用の種特異性が明確になった。

また、体内移行において最終的な寄生部位である小腸に辿り着き、成虫へと急激に成長するヤングアダルト (YA) について解析を行った。固有宿主のブタ小腸より回収した YA の形態は、大きさ以外成虫と類似していた。嫌氣的代謝系で機能する複合体 II の活性 (QFR 活性)、複合体 I の活性 (NADH-dRQ 活性) 及び構成キノンは成虫と同様であったが、複合体 I、II の複合活性 である NADH-フマル酸還元酵素活性は成虫型より低かった。さらに、複合体 II のサブユニット組成は、CybS は成虫型である一方、Fp に関しては幼虫型と成虫型の両者が観察された。これらの結果より、YA のエネルギー代謝系の変化は完了していないことが明らかになった。

ここまで報告してきた様な生活環における複合体 II の各サブユニットのステージ特異的発現を調節している機構を明らかにする目的で哺乳類や自由生活性線虫で低酸素適応に関与している転写因子である低酸素誘導性因子-1 (Hypoxia inducible factor-1 : HIF-1) について解析を行った。α、β 両サブユニットをクローニングした所、α サブユニットには酸素センサーとして水酸化されるプロリンが保存されている一方、他の生物では構成的に発現している β サブユニットの発現量が生活環の中で変動する事が明らかになった。この様に回虫特有の調節機構の存在が明らかになった

以上の結果に加え、同じ蠕虫類に属する条虫であるエキノコックスの幼虫が回虫成虫同様にフマル酸呼吸によってエネルギー代謝を行っており、京都大学の三芳秀人教授との共同研究で見出した線虫特異的に複合体 I を阻害するキナゾリン系化合物がエキノコックス幼虫を培養系において刹滅することが判った。この様にキナゾリン系化合物は現在特効薬のない多包条虫症治療のリード化合物として極めて有望であり、今後の開発をめざしたい。

また、膵臓ガンなどある種のガン細胞では低栄養・低酸素の環境で回虫同様にフマル酸呼吸系が誘導される事が判った。そして抗ギョウ虫薬でフマル酸呼吸を阻害するピルビニウムによって膵臓ガン細胞の増殖が抑えられるメカニズムが確かにフマル酸呼吸系の阻害による事を明らかにした。この事実は低酸素適応におけるフマル酸呼吸の普遍性と新たな抗がん剤の標的としての意義を明確にしたものであり、多方面にわたる今後の

展開が期待できる。

ヒトの複合体 II には回虫の様に複数の酵素は見つかっていなかったが、我々は Fp に 2 アミノ酸異なるアイソフォームを見出した。このアイソフォームはある種のガン細胞や胎児組織で発現されており、ヒト細胞におけるフマル酸呼吸を担っている可能性も考えられる。この点に関しても今後の研究を鋭意、進めて行きたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件) 全て査読あり

1. Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389. Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto, S., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K. and Omura, S. Tetrahedron, 掲載確定 (印刷中)
2. Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species (ROS) from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. Paranagama, M. P., Sakamoto, K., Amino, H., Awano, M., Miyoshi, H. and Kita, K. (2010) Mitochondrion, 10, 158-165
3. Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with specific inhibitor, flutolanil. Osanai, A., Harada, S., Sakamoto, K., Shimizu, H., Inaoka, D. K., and Kita, K. (2009) Acta Crystallographica, F65, 941-944
4. Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit. Tomitsuka, E., Kita, K. and Esumi, H. (2009) Proc. Jap. Acad. B85, 258-265
5. Freezing survival of the nematode *Caenorhabditis elegans* in the presence of a cryoprotectant. Hayashi, M., Oguma, T., Amino, H., Kita, K. and Murase, N. (2009) Cryobiology and Cryotechnology, 55, 9-22
6. 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

7. 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
8. 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
9. Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies. Kita, K., Shiomi K., and Ōmura, S. (2007) Trends in Parasitol. 23, 223-229

[学会発表] (計 20 件)

1. 遠海重裕、坂元君年、後藤美穂、松本淳、八木欣平、片倉賢、奥祐三郎、藤田修、野崎智義、北 潔「エキノコックスミトコンドリア呼吸鎖複合体 II assembly factor のクローニング」第 70 回日本寄生虫学会東日本支部大会 平成 22 年 10 月 2 日
2. Kita K. 「Novel enzymes of parasite mitochondria essential for their survival」The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2010, Sept 8, Awaji (Hyogo)
3. 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 10 日
4. 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 9 日

[図書] (計 1 件)

1. 北 潔 サイエンスフォーラム社
微生物資源国際戦略 2009
448 ページ

[産業財産権]
○出願状況 (計 1 件)

名称: 内部寄生虫防除剤
発明者: 北 潔、諏訪 明之
権利者: 東京大学、日本農薬株式会社
種類: 特許権
番号: 特願 2011-045042
出願年月日: 平成 23 年 3 月 2 日
国内外の別: 国際特許

[その他]
ホームページ:
<http://www.biomedchem.m.u-tokyo.ac.jp/>

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
なし

(3) 連携研究者
なし