

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590434
 研究課題名(和文) クルーズトリパノソーマ原虫のシアン感受性新規キノール酸化酵素の解析
 研究課題名(英文) Molecular characterization of a novel cyanide-sensitive quinol oxidase of *Trypanosoma cruzi*

研究代表者

鈴木 高史 (SUZUKI TAKASHI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号：70305530

研究成果の概要(和文)：

クルーズトリパノソーマ原虫の呼吸システムを明らかにするために、TcrAOX 分子に注目し解析を行った。その結果、TcrAOX は他の生物の AOX とは進化的に異なり、大腸菌の増殖率を増大する効果があり、酸化酵素活性があることが示唆された。トリパノソーマ原虫細胞では TcrAOX 分子はミトコンドリア内に存在し、TcrAOX 分子の過剰発現を行うと、増殖率の顕著な上昇が見られた。本分子のノックアウト株作製を試みたが、両アレルを除くことができなかった。以上より、TcrAOX は原虫細胞において、増殖に重要な役割を担っており、酸化酵素活性を有すると強く示唆されたが、その基質はキノールではないと考えられた。

研究成果の概要(英文)

In this analysis, properties of *Trypanosoma cruzi* alternative oxidase (TcrAOX) were analyzed. Phylogenetic analysis demonstrated that TcrAOX molecule was placed distantly from other AOX molecules. When TcrAOX was expressed in *Escherichia coli* cells, the *E. coli* cells showed increased growth, suggesting an oxidase activity of TcrAOX. In *T. cruzi* cells, TcrAOX was localized in mitochondria. Over-expression of TcrAOX in *T. cruzi* cells caused increased growth. Depletion trials of both alleles of TcrAOX failed. Thus TcrAOX was considered to possess an important role for *T. cruzi*-growth, possibly oxidase activity, while its substrate did not seem to be quinol.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：クルーズトリパノソーマ、酵素、ミトコンドリア、増殖

1. 研究開始当初の背景

シャーガス病は、1909年に始めて発見された疾病で、クルーズトリパノソーマ原虫 (*Trypanosoma cruzi*) によって起こる疾患である。世界保健機構 (WHO) は、本症を克服すべき感染症として指定している。

現在は、北米の南部、中米、南米等の18カ国で発症が見られ、毎年、13,000人が死亡している。感染動物は多くの野生動物と家畜 (イヌ、ネコ) に見られ、ヒトの健康保虫者もいる。

シャーガス病のヒトへの感染は、サシガメ (Triatominae) によって媒介される。サシガメは吸血する段階で感染し、感染したサシガメは大量の原虫を糞中に排泄する。サシガメの排便は、刺撃のタイミングと一致しており、感染した糞が刺咬創付近の皮膚の上に落とされる。そのため、その後、ヒトが皮膚を引っかいたり、粘膜特に結膜を擦ったりしたときに、刺咬創から病原体が体内に侵入する。また、極めて希に、媒介昆虫を介さずに胎盤感染、母乳、輸血、実験室での事故や感染動物の死肉からも感染する場合もある。

シャーガス病の症状は、高熱、頭痛、関節痛を呈し、適切な治療を受けないと重症化し、昏睡に陥り結果的に死亡することがある。

シャーガス病対策として、これまでに1) 殺虫剤によるサシガメ対策、2) 薬剤による予防・治療等が試みられてきたが、殺虫剤耐性サシガメの出現、クルーズトリパノソーマ原虫の薬剤耐性のため、今のところ効果的な方法は見つかっていない。

2. 研究の目的

上記のような背景の元、申請者は薬剤の標的としてのクルーズトリパノソーマ原虫の呼吸系の解析を進めてきた。その結果、①新規な alternative oxidase 様酵素 (TcrAOX) の存在が示唆され、②本酵素はシアン感受性である可能性が示唆された。従って、本酵素を含む原虫呼吸鎖は新規薬剤開発にあたって有望な標的と考えられた。

そこで以上の予備的解析をもとに、以下の2点から解析を進めることにした。

(1) TcrAOX 分子のプロファイル解析

(2) TcrAOX 過剰発現原虫作製による TcrAOX 酵素の原虫における生理学的機能解析

3. 研究の方法

(1) TcrAOX 分子のプロファイル解析

クルーズトリパノソーマ原虫の TcrAOX 分子は一般の AOX 分子と異なる配列で、E、EXXH の保存配列も不十分である。従って従来の AOX とは異なる活性を有していると推定される。これを明らかにするために、ヘム合成酵素欠損大腸菌株 (FN102) で TcrAOX の発現を行い、分光光度計を用いてキノール酸化酵素活性解析を解析した。また、C 源としてグリセロールのみの存在培地 (S 培地) で、TcrAOX 分子発現大腸菌の生育の可否をみた。さらに抗体を作製し、本分子の *T. cruzi* 原虫における発現プロファイル解析を行った。

(2) TcrAOX 過剰発現原虫作製による TcrAOX 酵素の原虫における生理学的機能解析

原虫発現ベクター (pTEX vector) に TcrAOX 遺伝子を組み込み、培養 *T. cruzi* 原虫昆虫型 (epimastigote) にエレクトロポレーション法により導入した。G418 でスクリーニングを行い、過剰発現株を得た。

4. 研究成果

(1) TcrAOX 酵素のプロファイル解析

TcrAOX 分子の系統樹解析を行ったところ、図1に示すように、一定の相同性は示すが、既知の AOX 分子とは異なる分子であることが示された。

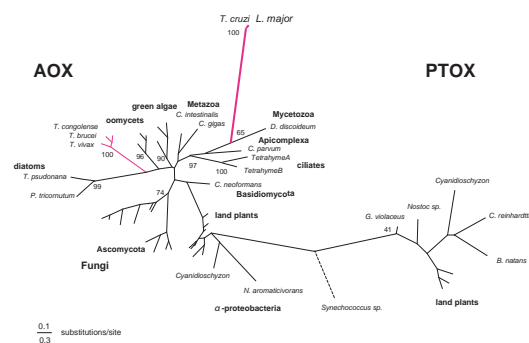


図1 TcrAOX 分子の系統樹解析 (最尤法)。

次に、本分子の *T. cruzi* 原虫における発現プロファイル解析を行ったところ、epimastigote, trypomastigote, amastigote のいずれも膜画分に発現が見られた (図2)。

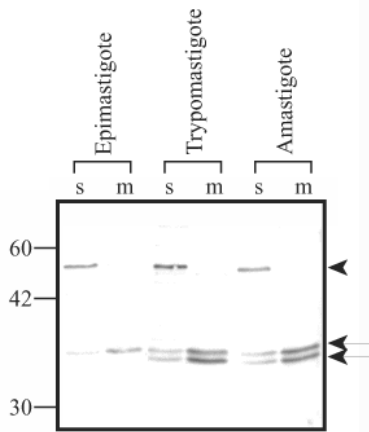


図 2. Western blot (α -TcrAOX)

s: soluble fraction

m: mitochondrial fraction

次に本抗体を用いて、免疫染色を行ったところ、ミトコンドリア内に局在していると推定された (図 3)。

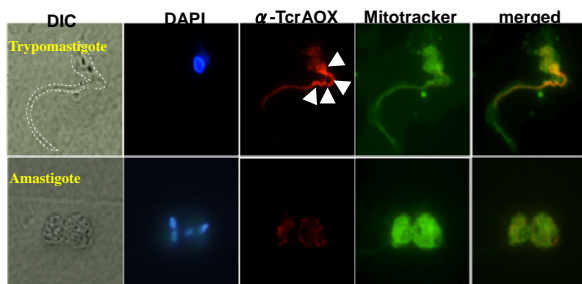


図 3 TcrAOX 分子の免疫染色像。

次に、TcrAOX 発現ベクターをヘム合成酵素欠損大腸菌株に導入したところ、ベクターのみのコントロールでは、C 源としてグルコースを含有しない S 培地で増殖できなかったのに対し、TcrAOX 発現ベクターを組み込んだ大腸菌では増殖が見られた (図 4)。

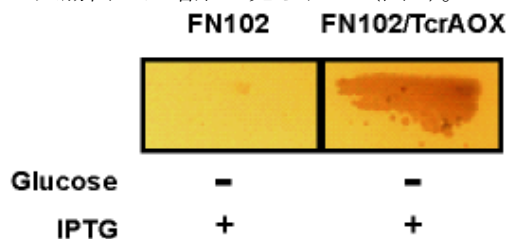


図 4 TcrAOX 分子発現ベクターを組み込んだ大腸菌の S (寒天)培地上での増殖。

そこで、次に、液体培地で同様に増殖解析を行った (OD600=0.1 で IPTG 誘導をかけた)。その結果、図 5 のようにコントロールと比較して、増殖率の増大効果が見られた。

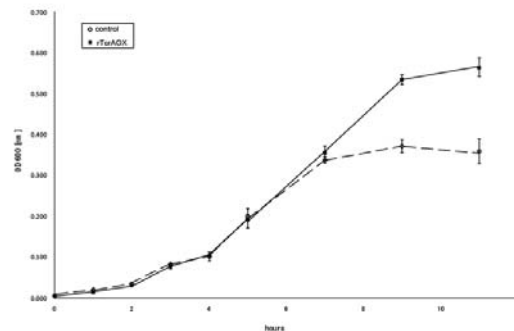


図 5 TcrAOX 分子発現ベクターを組み込んだ大腸菌の S (液体) 培地上での増殖曲

ヘム欠損大腸菌の増殖効果がみられたので、膜画分を抽出して、キノール酸化酵素活性解析を行った。その結果、TcrAOX 分子には再現性のある酵素活性を得ることができなかった。ユビキノールを大量に (定量解析ができないレンジ) で加えたところ、弱いキノール酸化酵素活性が認められ、さらにその活性は 5mM KCN で阻害された。従って、TcrAOX 分子は、シアン感受性酸化酵素活性を有すると示唆された。しかし基質の量を考慮すると、本酵素の基質はユビキノールではないと考えられ、引き続き、検証が必要であると考えられた。

(2) TcrAOX 過剰発現原虫作製による TcrAOX 酵素の原虫における生理学的機能解析

TcrAOX の原虫細胞での機能を調べるために、ノックダウンを試みた。その結果、ひとつのアリールは除去可能であるが、他は除去できなかった。これはネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子で置き換え、それら抗生物質でスクリーニングを行ったものであるが、どちらの抗生物質耐性遺伝子を先に用いてもノックアウト株を得ることができなかった。このことから、本分子はトリパノソーマ原虫の増殖に必須分子であると考えられた。

次に、トリパノソーマ原虫細胞で、TcrAOX 分子の強制発現を試みた。発現ベクター pTEX にクローニングを行い、さらに発現量をモニターするために、GFP も組み込み、強制発現を行った (pTEX-AOX-GFP)。その結果、細胞レベルでの発現はあまり見られなかった (図 6)。メッセンジャーレベルでの発現は増加していたので、翻訳レベルでの発現調整に問題があると考えられた。そこで、IRES 配列

を追加し、同様に発現を GFP でモニターしてみた (pTEX-AOXIRES-GFP)。その結果 pTEX-AOXIRES-GFP 導入原虫は GFP のシグナルが強く、すなわち、AOXIRES-GFP 分子が強く発現していることが明らかになった。

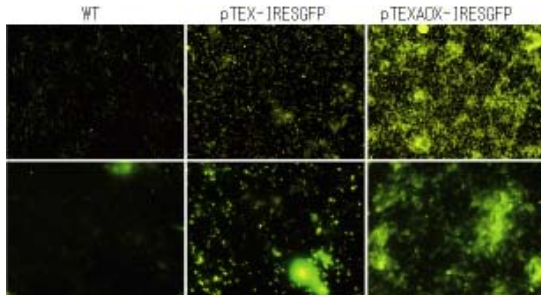


図6 トリパノソーマ原虫の蛍光画像。WT, pTEX-AOX-GFP, pTEX-AOXIRES-GFP

そこで、これらの原虫細胞を用いて、増殖曲線を描いてみた (図7)。その結果、グラフから明らかなように、TcrAOX 強制発現トリパノソーマ原虫で増殖率の顕著な増大が観察された。

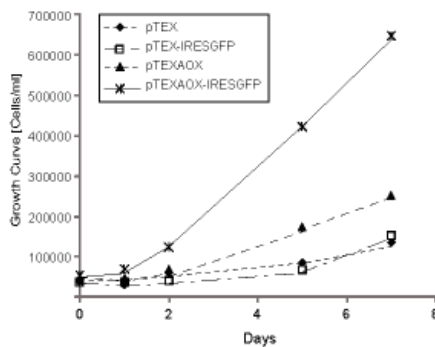


図7 トリパノソーマ原虫の増殖曲線。pTEX, pTEX-AOX-GFP, pTEX-AOXIRES-GFP

以上を総合して、TcrAOX は原虫細胞において、増殖に重要な役割を担っており、酸化酵素活性を有すると強く示唆された。その基質は現時点では不明であり、その同定を行うことにより本分子の機能がより明らかになると考えられた。

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 Kido Y, Sakamoto K, Nakamura K, Harada M, Suzuki T, Yabu Y, Saimoto H, Yamakura F, Ohmori D, Moore A, Harada S, Kita K. Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys Acta*. Epub 2010 Jan 4. 査読有
- ② Agüero F, Al-Lazikani B, Aslett M, Berriman M, Buckner FS, Campbell RK, Carmona S, Carruthers IM, Chan AW, Chen F, Crowther GJ, Doyle MA, Hertz-Fowler C, Hopkins AL, McAllister G, Nwaka S, Overington JP, Pain A, Paolini GV, Pieper U, Ralph SA, Riechers A, Roos DS, Sali A, Shanmugam D, Suzuki T, Van Voorhis WC, Verlinde CL. Genomic-scale prioritization of drug targets: the TDR Targets database. *Nat Rev Drug Discov*. 2008, 7(11):900-7. 査読有
- ③ Lu S, Suzuki T, Iizuka N, Ohshima S, Yabu Y, Suzuki M, Wen L, Ohta N. *Trypanosoma brucei* vacuolar protein sorting 41 (VPS41) is required for intracellular iron utilization and maintenance of normal cellular morphology. *Parasitology*. 2007, 134:1639-47. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① Molecular analysis of “movement”-related genes of African trypanosome species. Suzuki T, Ohshima S, Ohashi M, Yabu Y, Miura Y. 第78回日本寄生虫学会大会 2009.3.27. 東京
- ② Aguero F, Berriman M, Buckner F S, Hertz-Fowler C, Nwaka S, Pain A, Ralph S A, Riecheres A, Roos D S, Shanmugam D, Suzuki T, Verlindre C L, Van Voorhis W C. WHO/TDR Drug Target Portfolio: Computational prioritization of potential drug targets for human parasitic diseases. COST B22 Annual Congress, Dundee, UK. 2007.6.10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 高史 (SUZUKI TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70305530

(2)研究協力者

大島 茂 (OHSHIMA SHIGERU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

鈴木 光子 (SUZUKI MITSUKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号 : 50507613