

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2006～2010

課題番号：18GS0314

研究課題名（和文） マラリア原虫類を中心としたオルガネラの多様なエネルギー転換機構

研究課題名（英文） Diversity of energy transducing mechanism by organelle from the parasites such as Plasmodium

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：オルガネラ、寄生虫、感染症、エネルギー代謝、細胞・組織、進化、特殊環境、微生物

### 1. 研究計画の概要

真核生物は細胞内に種々のオルガネラを持ち、それらの働きによって高度な生物機能を支えている。それらの中で、ミトコンドリアや葉緑体は細胞の生存、増殖に不可欠なエネルギー転換反応を担うオルガネラであり、精力的な研究が進められた結果、その起源、反応機構、相互作用に関して多くの事実が明らかになってきた。さらに低酸素環境に適応し、好気性生物とは大きく異なった寄生性生物の特殊なミトコンドリアの存在が明らかになり、ミトコンドリアを持たない真核生物まで報告されるようになってきた。さらに興味深い事に、年間数百万人の死者を出すマラリアの病原体であるマラリア原虫が、機能的に未分化の葉緑体（アピコプラスト）を含んでいる事実が明らかとなった。この様に従来のミトコンドリアや葉緑体の概念を越え、独自の DNA を含む多様なオルガネラが寄生性の生物で発見されつつある。しかし、その成立過程、生理機能の詳細、オルガネラ間の相互作用に関する情報はごく僅かであり、エネルギー転換機構の基本原理の解明とともにオルガネラの多様性に関する生物学的意義の解明が求められている。

そこで本研究ではこれらの未知の問題を解決し、これまでのモデル生物の研究からは想像もできなかったようなオルガネラの多様なエネルギー転換機構を解明するとともに、この機構を中心としたオルガネラ間のダイナミックな相互作用、さらにはその進化について考察するための確かな基盤を確立する事を目的としている。本研究では生化学、分子生物学、細胞生物学、分子寄生虫学、進化学などこれらの課題に直接関連する分野

の研究者が緊密な関係をとって研究を進め、これまでになかった包括的組織的研究体制を構築する事により、未来予測も含めた新しいオルガネラについての学問領域を創る事が期待できると考えている。

以上の目的から

(1) オルガネラ間相互作用とオルガネラの進化、(2) オルガネラ DNA の複製と転写およびタンパク質合成系、(3) ミトコンドリアと共通祖先を持つオルガネラ の3 課題に焦点を絞って研究を進めている。

### 2. 研究の進捗状況

#### (1) オルガネラ間相互作用とオルガネラの進化

ミトコンドリアおよびアピコプラストをそれぞれ GFP で標識し、パーコールやセルソーターで分離を試みた結果、両者に強い相互作用が見られた。これに対して細胞骨格関連の阻害剤の効果を検討したところ、両者が一部分離する事が判り、さらに両者の分離を試みた結果、それぞれのオルガネラのみを含む画分が得られる方法を見出す事ができた。

また、マラリア原虫のミトコンドリアゲノムの進化速度とアピコプラストの起源に関しては、赤血球期では呼吸系が十分には機能していないマラリア原虫ミトコンドリアのゲノム進化速度を検討したところ、核ゲノムハウスキーピング遺伝子と同程度であり、ミトコンドリア DNA の進化速度が速いほ乳類と大きく異なることが明らかになった。さらに、マラリア原虫と系統進化的に近縁のピロプラズマのゲノム構造と進化速度が異なっている事が判った。さらにピロプラズマの原虫 4 種のミトコンドリア (mt) ゲノムの構造を

解析した結果、その多様性が明らかとなり、特に *B. rodhaini* では異なる遺伝子配置を持つ mt ゲノムが 4 タイプ存在し、1 つはマラリア原虫のもの一致した。

さらにマラリア原虫類とそれに最も近縁な渦鞭毛藻（渦鞭毛虫）との分岐点近傍に位置づけられているベルキンススに葉緑体関連遺伝子候補群を見出した。一方、ベルキンススのアピコプラストが DNA を持たない事を強く示唆する結果を得た。

#### (2)オルガネラ DNA の複製と転写およびタンパク質合成系

モデル生物である真正粘菌および線虫オルガネラの核様体タンパク質の網羅的解析およびミトコンドリアリボソームタンパク質の候補遺伝子へのタグの付加による解析系の確立を開始した。その結果、マラリア原虫のアピコプラストの核様体タンパク質 PfHU を大腸菌で発現させ、抗体を用いて局在の決定し、さらにアピコプラスト DNA との結合様式、また欠損変異株を用いた大腸菌での機能的相補を明らかにした。

#### (3)ミトコンドリアと共通祖先を持つオルガネラ

赤痢アメーバのミトコンドリア関連オルガネラ（マイトソーム）の精製法の最適化を開始し、またマイトソームへの移行シグナルを有すると予想される組換えタンパク質の作製・エピトープ標識体を発現した原虫形質転換体などの作製を進めた。その結果、パーコールを用いた赤痢アメーバのミトコンドリア関連オルガネラ（マイトソーム）の精製法を確立し、高純度のマイトソームを得て、プロテオーム解析を進めたところ、イオウ代謝に関連する特殊なタンパク質群が同定された。

### 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

これまでマラリア原虫のオルガネラの同定や分離は特殊プローブや特異的抗体による可視化に基づく細胞生物学的なアプローチが主であったが、本研究では初めてタンパク質レベルで生化学的に扱う事ができるところまで到達した点は高く評価できる。またマラリア原虫を含むアピコンプレックス門の核、オルガネラ DNA の詳細な分子進化的な解析から、これらの原虫オルガネラの成立過程を考察する情報が得られつつある。そして、そのオルガネラ DNA の維持に関わる HU を同定し、機能解析まで進めた点から、本研究はおおむね順調に進展していると考えられる。さらに最近まで実態がほとんど判っていなかった赤痢アメーバのマイトソームに関して、プロテオーム解析まで進む事ができた点は予想外の進展であった。

### 4. 今後の研究の推進方策

それぞれの項目について最終目標に向け、計画に従って研究を進める。すなわちマラリア原虫などアピコンプレックスに関してはミトコンドリアとアピコプラストの相互作用、機能の特徴をオルガネラ DNA と共に解析して行く。さらにマイトソームに関しては、その特殊な機能と生理的な特徴を明らかにし、これら原虫の寄生適応の戦略とそれに関わるオルガネラの役割を明らかにする。

### 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 14 件)

The *Plasmodium* HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival. Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki, S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., Kita, K., Sato, S. (2009) FEBS Lett. 583, 1446-1450 査読有

Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) J. Biol. Chem. 284, 7255-7263 査読有

Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita K. (2009) J. Biochem. 145, 229-237 査読有

Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo<sub>2</sub>) of the cytochrome *b* gene. Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, Kita K., and Marzuki S. (2008) Parasitol. Int. 57, 229-232 査読有

A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. Matsuzaki M., Kuroiwa H., Kuroiwa T., Kita K. and Nozaki H. (2008) Mol. Biol. Evolution 25, 1167- 1179 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

〔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](http://www.sih.m.u-tokyo.ac.jp/chem_top-J.html)