

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07523

研究課題名(和文)トリパノソーマクルージの細胞内寄生期におけるATP代謝の可視化による単一細胞解析

研究課題名(英文)Imaging the ATP metabolism in Trypanosoma cruzi intracellular amastigotes

研究代表者

稲岡 健ダニエル(Inaoka, Ken Daniel)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：10623803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、「ATP合成の単一細胞解析を行うためのツール開発」を行い、ATPのバイオセンサーとして開発されたATEAMをT. cruziのミトコンドリア、グリコソーム、細胞質それぞれに発現させた各種組換え原虫作製を試みたが得られなかった。精製した各種ATEAMを用いて、ATP濃度依存的にFRETシグナルの上昇が確認出来た。

グリコソームおよび細胞質にATEAMを発現させたT. brucei株は獲得したが、両者ともに凝集体のシグナルを示し、原虫においてATEAMを発現させると毒性を示す事が判った。現在、新たに開発されたATPバイオセンサー(MaLion)を用いて、同様に組換え原虫の作成を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々な方法でATEAMの発現をT. cruziまたはT. bruceiで試みたが、原虫に対する毒性を示したため解析不可能であった。さらに、原虫由来のε-サブユニットを用いて作成したATcEAMおよびATbEAMではATPが結合せず、FRETを起こさないことが明らかとなった。そして、原虫ミトコンドリア内にはATP合成酵素以外に、ATP生産に寄与する新たな経路(ASCT/SCSサイクル)が明らかとなり、哺乳宿主の寄生環境に適した指摘温度であった。このことから、寄生虫は寄生環境に適応するためには、ウイルス、細菌と真菌といった病原体とは異なる、想定外な手段を用いる事が改めて判った。

研究成果の概要(英文)：The ATeam (a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based ATP biosensor) was developed to specifically visualize in real-time the ATP levels in a single living cell. We have attempted to generate transgenic Trypanosoma cruzi expressing ATeam in glycosome, cytosol and mitochondria. Despite of several attempt and effort, no transgenic parasite could survive during the selection process by G418. Moreover, similar experiment was conducted in T. brucei and after several attempt, T. brucei expressing glycosomal ATeam and cytosolic ATeam was obtained, but not the mitochondrial ATeam. Despite the effort, both transgenic parasites showed an aggregation pattern, indicating that ATeam when expressed in trypanosomatid parasites shows sign of toxicity. Moreover, purified ATeam made from trypanosomal ATP synthase epsilon-subunit did not show FRET signal in the presence of ATP.

Currently, we are developing transgenic parasites expressing MaLion, a novel ATP biosensor.

研究分野：生化学

キーワード：寄生虫 エネルギー代謝 バイオセンサー ATP動態 ATEAM

1. 研究開始当初の背景

トリパノソーマ科原虫を対象とした研究から RNA editing、トランススプライシングや GPI アンカーといった生命現象が発見されてきた。個々の生物のゲノム情報が明らかになるにつれて、これら現象が広く保存されている事が判り、寄生虫は医学分野のみならず、基礎生命科学分野においても極めて重要な研究対象とされている。研究代表者が研究対象としているトリパノソーマ症はヒト及び家畜に感染する人獣共通感染症であり、深刻な人的・経済的被害により流行国の発展の妨げとなっている。主な罹患者は途上国の貧困層であり、新薬開発による利益が見込めない事から政府や企業は関心を示さず、WHO が顧みられない熱帯病として指定している。既存薬は副作用や薬剤耐性株の出現といった問題を抱えており、その克服のためには原理と標的の異なる新薬開発が必須である。

研究代表者のグループは、寄生虫のエネルギー代謝経路が多様であり、各宿主内環境中の炭素源と酸素濃度の変化に伴いエネルギー代謝経路を巧妙に変化させ、環境適応している事を明らかにしてきた。その中でも特にミトコンドリアを中心としたエネルギー代謝経路は重要な役割を担っている。本研究で対象とする *T. cruzi* は中南米に広く分布し、吸血性のサンガメによって媒介される病原体で、その生活環において、昆虫内のエピマシゴート (EPI)、血流中のトリポマシゴート (TRP)、細胞内寄生するアマシゴート (AMA) の3つのステージに大きく分けられる (図1)。その中でも、AMA は細胞内で増殖し宿主細胞を死滅させることで病原性を発揮することから、臨床的に最も重要なステージであり、治療においては AMA のコントロールが必須である。EPI、TRP、AMA では寄生環境が大きく異なることから、それぞれの環境に適応するためにエネルギー代謝を大きく変化させていると考えられる。*T. cruzi* では、ミトコンドリアにおいて酸化リン酸化により ATP 合成が行われているが、ATP 合成に必要な酵素群の構成や性質がヒトとは異なる事を研究代表者等は明らかにしてきた。さらに、トリパノソーマ科原虫には、グリコソームと呼ばれる特有な細胞小器官が存在し、解糖系酵素群 11 種類のうち 8 酵素が局在する。グリコソームには解糖系他、グリセロール代謝、ピリミジン生合成など、多数の代謝経路が収束する上に、重要な ATP 合成の場である事を私たちは明らかにしてきた。また、ATP 合成に関わる解糖系の最終 3 酵素は細胞質に局在し、細胞質でも ATP が合成されている。この様に、*T. cruzi* では、ミトコンドリア・グリコソーム・細胞質の3細胞区画で ATP が合成されている。*T. cruzi* のエネルギー代謝は宿主と異なる点が多く、寄生現象を理解する上で非常に重要であり、また有望な薬剤標的経路である事が推測される。これまで、*T. cruzi* のエネルギー代謝研究は比較的培養が容易である EPI 及び TRP を用いて行われてきた。一方、AMA では原虫の大量培養・精製法が確立しておらず、解析が困難である。また、既存の方法では集団を解析する事から、単一細胞レベルで AMA の ATP 合成に対する空間的・時間的な分布・変動の解析は不可能である。そのため、臨床的に重要であるにもかかわらず、AMA のエネルギー代謝の詳細は不明である。そこで、我々は、研究協力者である京都大学・今村博士により開発された、ATP プローブ (ATeam) に着目した (図2)。ATeam は、細菌由来の ATP 合成酵素のサブユニットの N 末と C 末に CFP 及び YFP が融合しており、ATP の結合により蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を起こす (図2)。これにより、ATP 合成カイネティクスを、単一細胞レベルでリアルタイムに解析する事が可能になった。

本研究では「*T. cruzi* の AMA では、どの細胞区画で、どの炭素源で ATP 合成が行われているか、またその生理的役割は？」という「問」を研究課題の核心とし研究を進める。

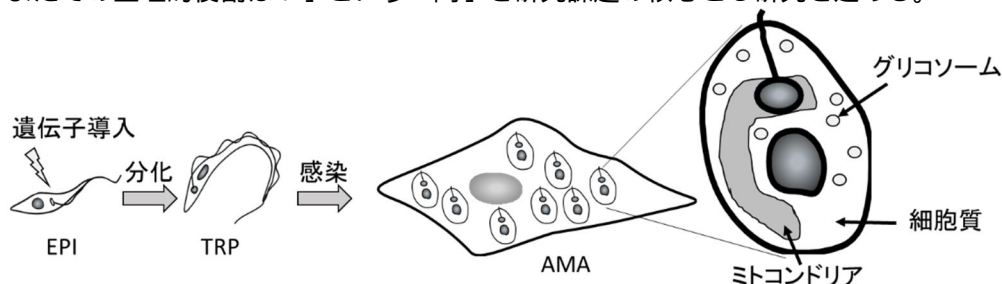


図1. 本研究で用いる *T. cruzi* の各ステージ (EPI、TRP、AMA) と ATeam を発現させる各細胞区画 (ミトコンドリア、グリコソームと細胞質) の模式図。

2. 研究の目的

本研究では、*T. cruzi* の AMA では不可能と思われていた「単一細胞レベルかつリアルタイム」でのエネルギー代謝解析を世界で初めて試みる。本研究で用いる ATeam は、研究協力者である今村博士が世界に先駆けて独自に開発した ATP 特異的なプローブであり、諸外国の研究者の追隨を許さない独自の・独創的な研究として国際的に高く評価されている (Imamura et al., PNAS, 2009)。研究代表者はこれまで数多くの寄生虫・細菌・ガン微小環境のエネルギー代謝の研究を

行って来た。その中でも得意とする寄生虫の生化学分野においては、*T. cruzi* のミトコンドリアとグリコソームで生存に重要な酵素や代謝経路を独自に見出し、創薬研究へと展開してきた。本研究は、寄生虫のエネルギー代謝に対し、ATeamという画期的な新手法を用いる事により、寄生現象の成立過程や代謝進化の基本原理解かりでなく、寄生適応における代謝制御とその生理的意義を理解しようとする、極めて独自性と創造性の高い研究である。

3. 研究の方法

本研究では、ATeamを用いて、AMAの単一細胞レベルでのATP合成の詳細を明らかにする。比較対象として、EPIとTRPのATP合成についても解析する。

まず、*T. cruzi* 過剰発現用プラスミド pTREX を用いて、ATeamをミトコンドリア、グリコソーム、細胞質それぞれに発現させた各種組換え原虫の作製を試みた。そのために、培養が容易なEPIを用いて形質転換を行い、組換え原虫のクローン化を試みた。なお、ミトコンドリア局在ATeam作製には、呼吸鎖複合体IIのミトコンドリア移行シグナルをATeamのN末に付加した。また、グリコソーム局在ATeam作製には、グリセロールキナーゼのグリコソーム移行シグナルを含むC末の13残基をATeamに付加した。そして、細胞質局在ATeam作製には、N末・C末ともにシグナルを含まないATeamを用いた。

ミトコンドリア型はシグナルペプチドが切断されたのち、細胞質型ATeamが実際にミトコンドリアのマトリックス内で機能するようにデザインした。そのため、細胞質型およびグリコソーム型のATeamを精製し、ATP存在下でFRETが検出できるかを確認した。その結果、両者ともにATP存在下でFRETの確認ができた(図3)。

次に、pTREXに挿入した各種インサートはシーケンス解析で確認し、Nucleofector 2b (Lonza)を用いて各種組換え原虫の作成を試みた。その結果、コントロールのLuc2発現原虫は再現性良く得られるが、ATeamを発現させた*T. cruzi*は得ることが出来なかった。そこで、アフリカ型トリパノソーマ(*T. brucei*)の血流型(BSF)を用いて、ATeamを*T. brucei*発現用プラスミド(pTubex)に挿入し、形質転換を行った。その結果、*T. cruzi*と同様にミトコンドリア型ATeamを発現させた*T. brucei*を得ることは出来なかったが、グリコソーム型と細胞質型のATeamを発現させた原虫を得ることが出来たが、両方とも凝集体を形成しており、解析に使用することが出来なかった(図4)。

研究協力者(今村)と議論し、バクテリア由来の ϵ -サブユニットで作成したATeamが、原虫内で毒性を示していることの可能性が示唆された。そのため、*T. cruzi*または*T. brucei*のATP合成酵素由来の ϵ -サブユニットを用いてATcEAMとATbEAMの組換え体を作成し、精製タンパク質の解析を行った。しかし、ATcEAMおよびATbEAMともに、ATP存在下においてFRETは検出できなかった。

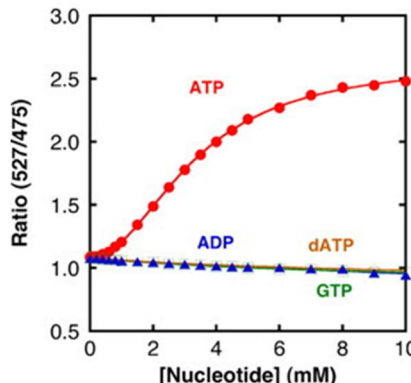
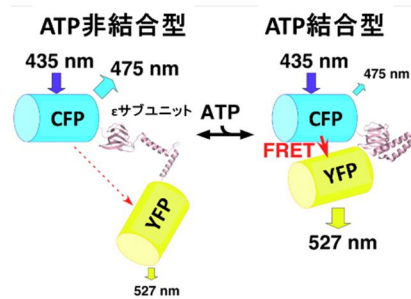


図2.(上) 蛍光ATPプローブATeamの原理。(下) ATP濃度依存的なFRETシグナルの増加。

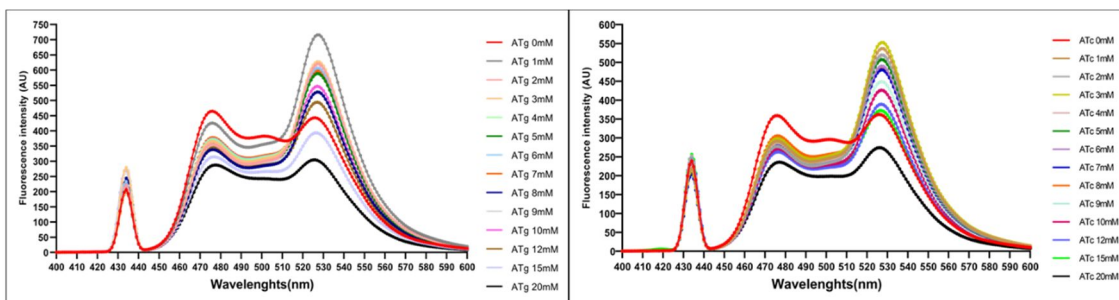


図3. グリコソーム型ATeam(左)と細胞質型(右)の組換えタンパク質を精製し、蛍光スペクトルを解析した(CFP励起波長、 λ_{ex} = 436 nm)。両者ともにATP濃度依存的にCFPの蛍光強度(475 nm)の減少とYFP蛍光強度(527 nm)が向上し、正常にFRETが検出できる。

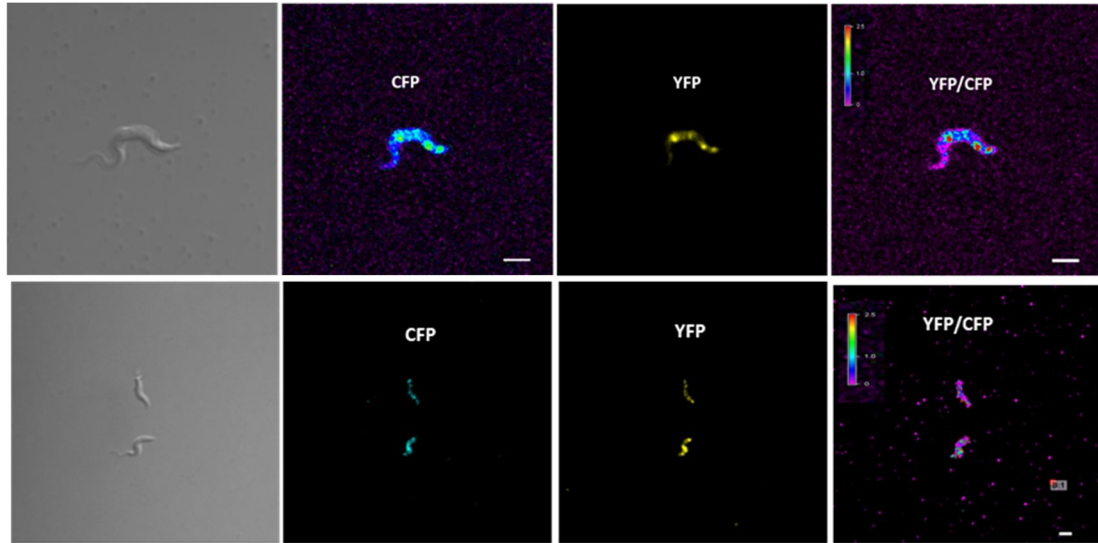


図 4. *T. brucei* 血流型にグリコソーム型 ATeam (上パネル) と細胞質型 (下パネル) を発現させ、CFP および YFP のシグナルを検出した。両者ともに、凝集体のシグナルが検出され、正常に発現しないのが判る。

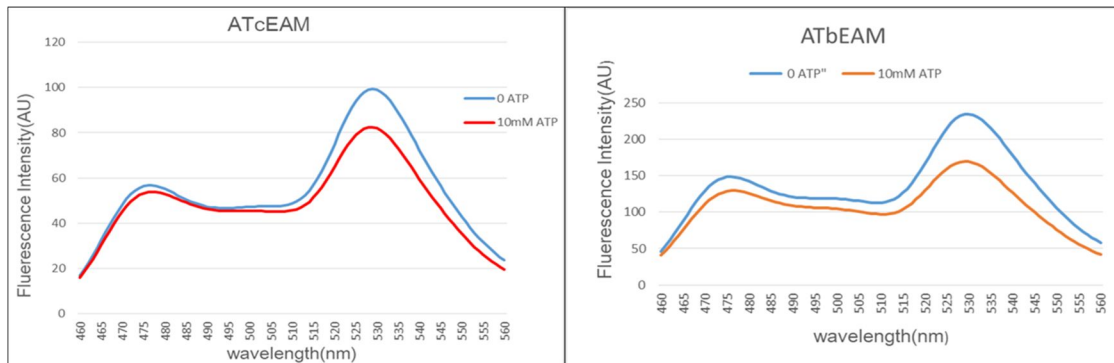


図 5. *T. cruzi* および *T. brucei* の ATP 合成酵素由来の γ -サブユニットを用いて作成した ATcEAM (左) と ATbEAM (右) の蛍光スペクトル (CFP 励起波長、 $\lambda_{ex} = 436$ nm)。両者ともに ATP を 10mM 加えても YFP 蛍光強度 (527 nm) が向上せず、むしろ減少する。

4. 研究成果

T. cruzi はシャーガス病を引起す寄生原虫で、その生活環において、媒介昆虫内 (EPI)、血流中 (TRP)、細胞内 (AMA) の 3 つのステージに大きく分けられる。臨床的に重要なのは AMA であるが、大量培養系が確立されておらず解析が困難である事から、特に研究が進んでおらず、AMA で用いられる炭素源やエネルギー代謝における各細胞小器官の役割など、基礎的な情報すら未だ不明である。本研究の最終目的は、寄生現象を支えるエネルギー代謝の生理的役割を解明することである。

私たちは、「ATP 合成の単一細胞解析を行うためのツール開発」を行い、ATP のバイオセンサーとして開発された ATeam をミトコンドリア、グリコソーム、細胞質それぞれに発現させた各種組換え原虫作製を試みたが、ATEam を発現する組換え原虫を得ることは出来なかった。*T. brucei* の結果から、毒性が指摘され、原虫由来の γ -サブユニットを用いて ATcEAM および ATbEAM を作成したが、FRET シグナル自体を検出できなかった (図 5)。

上記の事から、ATEam を用いて原虫の ATP 動態の解析は細胞毒性を示すため困難であり、原虫由来の γ -サブユニットを用いて作成した ATcEAM および ATbEAM では ATP が結合せず、FRET を起こさないことを明らかにした。この問題を克服するために、研究協力者と議論し、現在、新たに開発された ATP バイオセンサー (MaLion) を用いて、同様に組換え原虫の作成を行っている。この ATP バイオセンサーは FRET ではなく、単一蛍光タンパク質からなるセンサーであり、既にヒト・線虫・植物由来の細胞で ATP 動態を解析した実績がある (Arai *et al.*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, 2018)。

通常、ATP 合成酵素の γ -サブユニットは ATP 産生に必須であることから、トリパノソーマ科原虫のミトコンドリアエネルギー代謝における ATP 合成酵素の貢献に対し新たな疑問が生じた。そのため、長年共同研究を進めているポルドー大学の Frederic 教授とミュンヘン大学のマイケル教授と共にすすめた研究では、トリパノソーマ原虫は ATP 合成酵素の最も強力な阻害剤であ

る oligomycin A に対し耐性であり、ミトコンドリアに局在する酢酸：コハク酸 CoA 転移酵素 (ASCT) がサクシニル CoA 合成酵素 (SCS) と共役して ASCT/SCS サイクルを触媒し、このサイクルの分子活性が ATP 合成酵素に匹敵することを明らかにした (Kota et al., BBA Bioenergetics, 2020)。さらに、*T. cruzi* と *T. brucei* では ASCT/SCS サイクルの指摘温度が異なり、*T. cruzi* では 37、*T. brucei* では 30 であることを明らかにした (論文準備中)。すなわち、*T. cruzi* では哺乳宿主内の温度に適した ASCT/SCS サイクルを有することが分かった。一方、*T. brucei* では昆虫内温度に適した ASCT/SCS サイクルを持つにもかかわらず、血流型において機能していることも明らかにした (Kota et al., BBA Bioenergetics, 2020)。

上記に述べたように、本研究の最終目的は、寄生現象を支えるエネルギー代謝の生理的役割を解明することである。そして、寄生虫は寄生環境に適応するためには、ウイルス、細菌と真菌といった病原体とは異なる、想定外な手段を用いる事が改めて判った。この様な視点から、他の寄生虫のエネルギー代謝経路を再解析したところ、ヒトでは保存されていないリンゴ酸：キノン酸化還元酵素がアピコンプレクサ門で保存されていることが判り、世界で初めて組換え酵素の精製と生化学的解析に成功した (Acharjee et al. Int J Mol Sci., 2021)。さらに、マラリア原虫とアイメリア原虫のエネルギー代謝とピリミジン生合成経路に関わるジヒドロオロト酸脱水素酵素の解析も行い、その生化学的特性と阻害剤感受性がヒトの酵素と大きく異なることも明らかにした (Hartuti et al., Int J Mol Sci., 2021; Sato et al., Genes, 2020)。

今後は、寄生現象におけるエネルギー代謝経路の役割を明らかにする研究を、ウイルスや細菌などの病原体に展開していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mochizuki K, Inaoka DK, Mazet M, Shiba T, Fukuda K, Kurasawa H, Millerioux Y, Boshart M, Balogun EO, Harada S, Hirayama K, Bringaud F, Kita K.	4. 巻 1861(11)
2. 論文標題 The ASCT/SCS cycle fuels mitochondrial ATP and acetate production in <i>Trypanosoma brucei</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Bioenerg	6. 最初と最後の頁 148283(1-12)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2020.148283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamasaki S, Shoji M, Kayanuma M, Sladek V, Inaoka DK, Matsuo Y, Shiba T, Young L, Moore AL, Kita K, Shigeta Y.	4. 巻 1862(4)
2. 論文標題 Weak O ₂ binding and strong H ₂ O ₂ binding at the non-heme diiron center of trypanosome alternative oxidase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Bioenerg	6. 最初と最後の頁 148356(1-9)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2020.148356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato D, Hartuti ED, Inaoka DK, Sakura T, Amalia E, Nagahama M, Yoshioka Y, Tsuji N, Nozaki T, Kita K, Harada S, Matsubayashi M, Shiba T.	4. 巻 11(12)
2. 論文標題 Structural and Biochemical Features of <i>Eimeria tenella</i> Dihydroorotate Dehydrogenase, a Potential Drug Target	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 1468(1-18)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11121468.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Acharjee Rajib, Talaam Keith, Hartuti Endah, Matsuo Yuichi, Sakura Takaya, Gloria Bundutidi, Hidano Shinya, Kido Yasutoshi, Mori Mihoko, Shiomi Kazuro, Sekijima Masakazu, Nozaki Tomoyoshi, Umeda Kousuke, Nishikawa Yoshifumi, Hamano Shinjiro, Kita Kiyoshi, Inaoka Daniel	4. 巻 22
2. 論文標題 Biochemical Studies of Mitochondrial Malate: Quinone Oxidoreductase from <i>Toxoplasma gondii</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7830 ~ 7830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22157830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今村 博臣 (Imamura Hiromi) (20422545)	京都大学・生命科学研究科・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	ボルドー大学			
ドイツ	ミュンヘン大学 (LMU)			