

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06557

研究課題名（和文）マラリア原虫のアルテミシニン耐性においてフェレドキシンの変異が果たす役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of ferredoxin mutations in artemisinin resistance in malaria parasites

研究代表者

木股 洋子（Kimata, Yoko）

山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授

研究者番号：60255429

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）：マラリア熱は、蚊を介してマラリア原虫が体内に寄生することによって引き起こされる。アルテミシニンはその特効薬であるが、近年この薬に耐性を持つマラリア原虫が出現し、重篤な問題となっている。耐性の原因の1つとして、マラリア原虫が持つフェレドキシン(Fd)という電子伝達タンパク質の変異が報告された。本研究では、この変異Fdタンパク質を調製し、Fdが電子を授受する酵素(FNR)との親和性や電子伝達速度などのタンパク質機能に大きな変化があることを見出した。この結果から、Fdの変異が、Fdや関連酵素が司る種々の酸化的ストレス応答反応に影響することによって、薬剤耐性を引き起こすという仕組みを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア原虫の生化学的研究は、設備や培養材料の制約から限られており、アルテミシニンの標的や作用機序についてもごく少数例の報告しかない。本研究では、代表者らがこれまで蓄積してきた植物のフェレドキシンの生化学、物理化学、構造生物学的な知見や手法を用いて、マラリア原虫フェレドキシンが関与するアルテミシニン耐性の仕組みを提唱した。この仕組みの解明は、アルテミシニン耐性原虫の出現や拡散を抑制し、マラリア根絶を進めるための重要な情報を提供できると考える。

研究成果の概要（英文）：Malaria is caused by malaria parasites that infect the body through mosquitoes. Artemisinin is a special drug for this purpose, but in recent years malaria parasites that are resistant to this drug have emerged, posing a serious problem. Mutations in an electron transport protein called ferredoxin, which malaria parasites have, have been reported to be one of the causes of resistance. In this study, we prepared this mutant ferredoxin protein and found that there were significant changes in protein functions such as the affinity and electron transfer rate of ferredoxin with the enzymes that donates and/or accepts electrons (FNR). Based on these results, we proposed a mechanism in which mutations in ferredoxin cause drug resistance by affecting various oxidative stress responses controlled by ferredoxin and related enzymes.

研究分野：生体分子科学

キーワード：マラリア原虫 薬剤耐性 フェレドキシン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年マラリア熱の特効薬であるアルテミシニンへの耐性原虫が出現し、その全ゲノム関連解析が行われた。その結果、この耐性に関連するマラリア原虫の遺伝子座が明らかになり、フェレドキシン(Fd)の Asp97Tyr 変異を含む5つの遺伝子の変異が特に強い関連性を示した(図1)。

アルテミシニンの作用機序や生化学的標的については一致した見解は得られておらず、この耐性に上記5つの遺伝子が関与する仕組みは不明である。代表者はこれまで植物のFdの構造・性質やFdと電子を授受する酵素との相互作用・電子伝達機能について、生化学、物理化学、構造生物学的手法による定量的な解析を行ってきた。これらの知見や手法を応用し、植物型マラリア原虫Fdが関与するアルテミシニン耐性の機序を探求することによって、耐性を回避するための方法を提示しようと考えた。

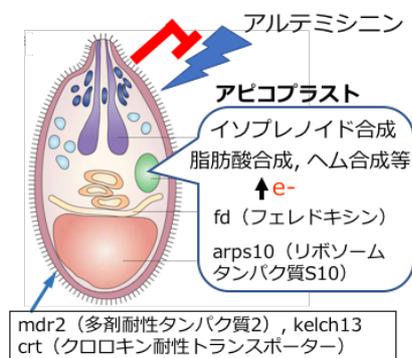


図1:マラリア原虫アルテミシニン耐性と強い関連が示された非同義置換変異

### 2. 研究の目的

マラリア原虫Fdの変異によりアルテミシニン耐性がもたらされる仕組みを明らかにすることを目的とする。Fd変異による機能変化がアルテミシニン応答にもたらす影響を多面的かつ定量的手法により精密に解析し、それらの結果を総合してマラリア原虫Fd変異によるアルテミシニン耐性メカニズムを提唱し、細胞レベルでの検証に繋げる。このメカニズムの解明により、アルテミシニン耐性を阻止する解決策の創出とマラリア根絶に貢献したい。

### 3. 研究の方法

(1) マラリア原虫Fdの Asp97 変異がもたらすタンパク質機能の変化を調べる。

Fdの Asp97 の部位特異的変異体が大腸菌の系により発現、精製し、その物理化学的な性質、電子伝達特性、アルテミシニンとの反応性等を野生型Fdと比較して解析する。

(2) マラリア原虫Fdが電子を供与する反応やFd依存代謝酵素の同定。

マラリア原虫Fd依存酵素の候補を、既に得ている遺伝子配列情報を基に調製し、Fd依存酵素としての検証や酵素機能解析を行う。

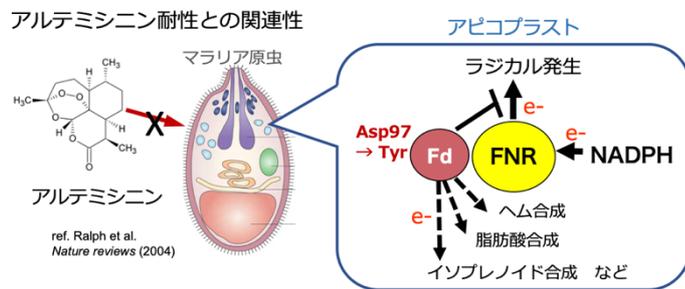
#### 4. 研究成果

(1) 調製した Fd 変異体を用いた *in vitro* 再構成系での電子伝達活性測定から、この Fd 変異が Fd の主要なパートナー酵素である Fd-NADPH 酸化酵素 (FNR) との親和性を大きく増加させる一方、電子伝達活性を低下させること (表 1) や、その他の Fd 依存反応へ影響を与えることが示され、論文発表した (2021, J. Biochem.)。

Table I. Steady-state kinetic parameters of PfFds for electron transfer reaction and dissociation constants ( $K_d$ ) with PfFNR.

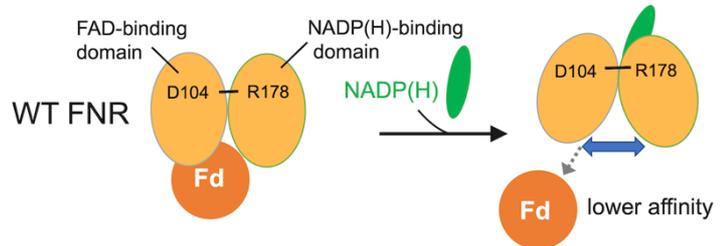
Pf Fd	Pf FNR		
	$K_m$ for Fd ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_d$ for Fd ( $\mu\text{M}$ )
Wild-Type	$1.3 \pm 0.3$	$22 \pm 1$	$3.2 \pm 0.7$
D97Y	$0.34 \pm 0.05$	$7.0 \pm 0.7$	$1.7 \pm 0.3$

(2) 同様の系を用いて、アルテミシニンが Fd と FNR の機能に与える影響や、野生型及び変異 Fd との反応性の違い等を解析した。その結果から、Fd の変異が FNR との親和性を大きく変えることが、Fd や FNR が関わる種々の酸化ストレス応答反応に影響し、アルテミシニン耐性に寄与することが考えられ (右図)、論文発表した (2022, Antioxidants)。



(3) Fd および NADPH による FNR の反応制御の分子メカニズムを、構造や機能情報が豊富な植物型 FNR を用いて詳細に解析し、論文発表した (2022, BBB, 2022, 2023 J. Biochem.) (右図)。これにより、マラリア原虫 Fd の結合による FNR 反応制御の仕組みについて知見が得られた。

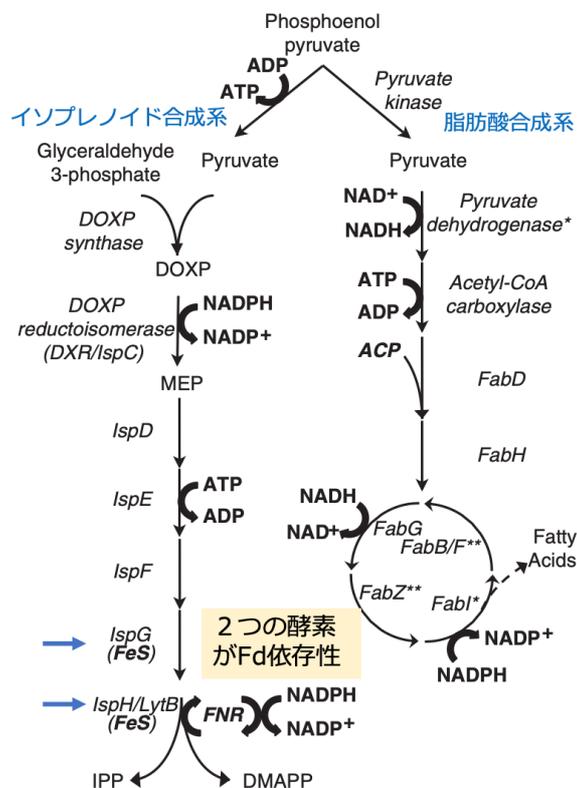
Schematic model for the decrease in the affinity between FNR and Fd by allosteric binding of NADPH.



(4) マラリア原虫の薬剤等による酸化ストレス下で、Fd 依存経路であるイソプレノイド合成系の遺伝子発現が特異的に上昇することが報告された。このことから、Fd 依存代謝の変動が薬剤耐性に寄与することが考えられ、その仕組みを遺伝子発現レベルで調べることにした。マラリア原虫の祖先的な位置付けにあるサンゴ共生褐虫藻を用いて、その Fd, FNR, イソプレノイド合成系の酵素 (右図) や、酸化ストレス応答遺伝子の発現解析を行う系を構築した。

(5) マラリア原虫の生育に必須であり、アルテミシニン耐性への寄与が指摘されているイソプレノイド合成系の Fd 依存酵素 (IspG) (右図) の発現系を構築した。

マラリア原虫アピコプラストにおける代謝や経路



#### <引用文献>

Kimata-Arigo Y, Shinkoda R, Abe R (2023). Inter-domain interaction of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase important for the negative cooperativity by ferredoxin and NADP(H). *Journal of Biochemistry*, 174(4), 327~334, <https://doi.org/10.1093/jb/mvad046>

Kimata-Arigo Y, Nishimizu Y, Shinkoda R (2022). Molecular mechanism of negative cooperativity of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase (FNR) by ferredoxin and NADP(H): role of the ion pair of ferredoxin Arg40 of and FNR Glu154. *Journal of Biochemistry*, 172(6), 377~383, <https://doi.org/10.1093/jb/mvac075>

Kimata-Arigo Y, Fukuta K, Miyata M (2022). Role of histidine 78 of leaf ferredoxin in the interaction with ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase: regulation of pH dependency and negative cooperativity with NADP(H). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 86(5), 618~623, <https://doi.org/10.1093/bbb/zbac022>

Kimata-Arigo Y, Morihisa R (2022). Effect of artemisinin on the redox system of NADPH/FNR/ferredoxin from malaria parasites. *Antioxidants*, 11(2), 273(1~10), <https://doi.org/10.3390/antiox11020273>

Kimata-Arigo Y, Morihisa R (2021). Functional analyses of *Plasmodium* ferredoxin Asp97Tyr mutant related to artemisinin resistance of human malaria parasites. *Journal of Biochemistry* 170(4), 521~529, <https://doi.org/10.1093/jb/mvab070>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kimata-Arigo Yoko, Shinkoda Rina, Abe Ryuya	4. 巻 174
2. 論文標題 Inter-domain interaction of ferredoxin-NADP+ reductase important for the negative cooperativity by ferredoxin and NADP(H)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 327 ~ 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad046	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Kimata-Arigo Yoko, Fukuta Karen, Miyata Masayuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Role of Histidine 78 of leaf ferredoxin in the interaction with ferredoxin-NADP+ reductase: regulation of pH dependency and negative cooperativity with NADP(H)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 618 ~ 623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac022	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 -
1. 著者名 Kimata-Arigo Yoko, Nishimizu Yoshiro, Shinkoda Rina	4. 巻 172
2. 論文標題 Molecular mechanism of negative cooperativity of ferredoxin-NADP+ reductase by ferredoxin and NADP(H): role of the ion pair of ferredoxin Arg40 of and FNR Glu154	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 377 ~ 383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac075	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 -
1. 著者名 Kimata-Arigo Yoko, Morihisa Rena	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of Artemisinin on the Redox System of NADPH/FNR/Ferredoxin from Malaria Parasites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 273 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11020273	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 Kimata-Arigo Yoko, Morihisa Rena	4. 巻 170
2. 論文標題 Functional analyses of Plasmodium ferredoxin Asp97Tyr mutant related to artemisinin resistance of human malaria parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 521 ~ 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab070	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木股洋子、新小田里奈、安部龍哉
2. 発表標題 フェレドキシン:NADP+還元酵素のドメイン間相互作用 (Asp104-Arg178イオン結合) が、NADPHによるアロステリックなフェレドキシンとの親和性抑制に重要である
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木股洋子、宮田昌幸、福田カレン、新小田里奈、西水禎朗
2. 発表標題 フェレドキシン:NADP+還元酵素とフェレドキシンとの親和性を、NADP(H)がアロステリックに抑制する分子メカニズム Molecular mechanism by which NADP (H) allosterically suppresses the affinity between ferredoxin:NADP+reductase and ferredoxin
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木股洋子、森久鈴菜、齊藤貴士、新小田里奈、西水禎朗
2. 発表標題 アルテミシニン耐性に関するマラリア原虫フェレドキシン変異体の機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木股洋子、坂本麻沙子、鎌谷美穂、森久鈴菜、齊藤貴士
2. 発表標題 マラリア原虫フェレドキシンとフェレドキシン-NADP(H)酸化還元酵素との結合に重要な芳香族アミノ酸残基間相互作用：アルテミシニン耐性との関連性
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	齊藤 貴士 (Saitoh Takashi) (00432914)	北海道科学大学・薬学部・准教授  (30108)	
研究分担者	小崎 紳一 (Ozaki Shin'ichi) (40280581)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授  (15501)	

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
---------	---------