

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590383

研究課題名（和文）ミトコンドリアプロテオームによる回虫呼吸鎖転換の網羅的解析

研究課題名（英文）Proteomic analyses of *Ascaris* mitochondrial respiratory chain

研究代表者

高宮 信三郎（TAKAMIYA SHINZABURO）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90138206

研究成果の概要（和文）：[目的]本研究は寄生蠕虫の酸素分圧の変化に応答する蛋白群、とくにミトコンドリア呼吸鎖の発現制御を包括的に解析することによって、その感染成立、維持機構の一端を解明する。[成果] 1)回虫成虫期に特異的に発現するシトクロム  $b_5$  は寄生適応において重要な役割を果たしていることが示された。2) ウエステルマン肺吸虫は好氣的ミトコンドリアと嫌氣的ミトコンドリアをそれぞれ異なった組織にもち、その微好氣的な棲息環境の酸素分圧変動に適応していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：**Objectives:**This research project was undertaken to elucidate underlying mechanisms for the establishment and maintenance of infection by analyzing expression and regulation of helminth proteins, especially mitochondrial proteins, responding to changing oxygen tension. **Achievements:**The current research showed: 1) *Ascaris suum* adult-specific cytochrome  $b_5$  played the crucial roles in the parasitic adaptation. 2) *Paragonimus westermani* possesses aerobic and anaerobic mitochondria in different tissues, adapting to fluctuating oxygen tension in microaerobic habitats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：ミトコンドリア、プロテオーム、回虫、ウエステルマン肺吸虫、 Manson 裂頭条虫

1. 研究開始当初の背景

申請者はおもに回虫をもちいて、寄生適応

という観点から、エネルギー生成系の中心的細胞内器官であるミトコンドリアの呼吸鎖および抗酸化系であるメトヘモグロビン還元系に着目し研究をすすめてきた。これまでの研究から、寄生蠕虫は宿主哺乳動物とは異なり、棲息環境の酸素分圧の高低に応じて酸素を用いる好氣的呼吸と、酸素を必要としない嫌氣的フマル酸呼吸を切り換え、調節してエネルギー生成を行うこと（呼吸適応）が明らかになってきた (Takamiya et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1141** 65-74 1993, Amino et al. *Mol. Biochem. Parasitol.* **128** 175-186 2003)。申請者ははじめて呼吸鎖の転換にユビキノンからロドキノンへの生合成の転換がともなうことを証明している。

また、ミトコンドリアの嫌氣的呼吸を担保する系として回虫成虫の体壁と体腔液に分泌型のシトクロム  $b_5$  を含むメトヘモグロビン還元系を見いだした。本系はヘモグロビンと協働して余剰の酸素を除去し、酸素毒から組織を防御する役割を果たすことを明らかにしてきた (Yokota et al. *Biochem. J.* **394** 437-447 2006, Hashimoto et al. *Arch. Biochem. Biophys.* **471** 42-49 2008, Takamiya et al. *Parasitol. Int.* **58** 278-284 2009)。

現在までにブタ回虫の低酸素適応にかかわる個々の分子については、幼虫および成虫の複合体 II、成虫のシトクロム  $c$ 、シトクロム  $b_5$  について精製あるいはクローニングされ、シトクロム  $b_5$  の X 線結晶構造も申請者らによって明らかにされているが、複合体 I, III, IV、特に呼吸の転換に必須なロドキノン合成に関与する酵素についてはまったく解明されていない。この理由は生化学的解析に耐えうる純度の高いミトコンドリアを十分量得るのが困難であること (特にサイズの小さい幼虫の場合) によるが、申請者と分担者はこれらの個別分子の分子特性を明らか

にすると同時に呼吸転換の全体像を記述するための新規なプロテオミック手法を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、寄生蠕虫のエネルギー生成系、および酸素代謝に直接関与する酸化還元系蛋白の発現制御を、包括的に解析することにより、好気から嫌氣的代謝への転換の実体とその分子機構を理解し、その感染成立、維持機構の一端を解明することを最終目的としている。そのため、1) エネルギー生成系の中心的オルガネラであるミトコンドリアを主な対象として、それぞれの発育段階におけるミトコンドリア蛋白の発現を網羅的に解析する。2) また、発育段階において特異的に発現する酸化還元蛋白の分子特性を明らかにする。3) 回虫を用いる研究と平行して、棲息環境が回虫とは異なる他の蠕虫、すなわち、肺吸虫、マンソン裂頭条虫のミトコンドリアについても同様なアプローチで解析する。

## 3. 研究の方法

[生物材料] ウエステルマン肺吸虫のメタセルカリアおよびマンソン裂頭条虫のプレロセルコイドは、サワガニ、シマヘビからそれぞれ採集した。研究に用いた寄生蠕虫は実験的に感染させたイヌから得た。実験動物を用いた研究はすべて動物実験倫理委員会の審査を受け承認された。

[方法] ミトコンドリアは常法にしたがって調製し、蔗糖密度勾配遠心により分画した。各分画について、密度、好氣的呼吸鎖および嫌氣的呼吸鎖のマーカー酵素であるシトクロム  $c$  酸化酵素、NADH-フマル酸還元酵素の活性をそれぞれ測定した。ミトコンドリアの形態は透過型電子顕微鏡で撮影後、画像解析ソフトでサイズおよび輝度を測定した。ミト

コンドリア中のキノン成分は、HPLC を用いて同定、定量した。組織中のミトコンドリアはシトクロム *c* 酸化酵素の活性染色による組織化学的手法を用いて解析した。酸化還元蛋白の分子特性の解析には、WormBase から DNA 情報を入手し、系統図作成に用いた。RT-PCR および DNA シークエンスは常法により行った。

#### 4. 研究成果

以前の申請者らの研究により、蠕虫起源としては最初に見いだされた、ブタ回虫シトクロム *b<sub>5</sub>* (以下 Cyt. *b<sub>5</sub>*) は可溶性の分泌型 Cyt. *b<sub>5</sub>* であることが明らかにされている。分泌型の Cyt. *b<sub>5</sub>* は回虫の本シトクロム以外には他に例がない、新しい分子種である。これまでに、本 Cyt. *b<sub>5</sub>* は成虫期に特異的に発現し、角皮下層と体腔液に分布、それぞれ NADH-メトミオ (ヘモ) グロビン還元系の構成成分として、両グロビン分子とともに酸素を基質とする生合成反応への酸素供給を保証しながら、余分な酸素分子を除くという、低酸素適応上不可欠な機能を有することが示されている。すなわち、NADH-Cyt. *b<sub>5</sub>* 還元酵素から電子をうけとり、体腔液中の機能しない酸化ヘモグロビン (メトヘモグロビン) あるいは体壁中の酸化ミオグロビン (メトミオグロビン) を還元して、本来の酸素結合能のあるヘモグロビン、ミオグロビンに戻す重要な働きをする。本シトクロムは他種由来のものとは異なる塩基性蛋白であり、X 線結晶構造解析の結果、その立体構造もほ乳類由来のものとは異なっている。これらの回虫 Cyt. *b<sub>5</sub>* のユニークな構造上の特異性と生理機能を考慮すると、本シトクロムは宿主腸腔の低酸素環境に適応する過程で特化した分子種と考えられる。この仮説を検証するために、同じ線虫類であり、すでにゲノムプロジェ

クトが終了した自由生活性の線虫 *C. elegans* の Cyt. *b<sub>5</sub>* の分子種について、データベースから検索したところ、4 種の分子種 (a), (b), (c), (d) を見出した。これらの回虫 Cyt. *b<sub>5</sub>* との関連性、さらに *C. elegans* における発現について解析した。いくつかの分子特性の比較解析、および分子系統解析から (d) が回虫 Cyt. *b<sub>5</sub>* と最も近縁であることが明らかになった。また、RT-PCR の結果、(d) は発現していないことが示された。これらの結果から、回虫 Cyt. *b<sub>5</sub>* の *C. elegans* におけるカウンターパートは (d) と考えられるが、常圧の酸素分圧下で棲息するため必要でなく、偽遺伝子化したものと考えられる。これらの知見は上記の仮説を支持するものであり、回虫における低酸素適応を系統進化の側面から明らかにしたという点で意義深いものである。

以上述べたように、申請者らは寄生蠕虫感染のモデル系としてブタ回虫を用いて研究を行っているが、同時に回虫とは寄生部位が異なる他の蠕虫の Mit についても、その棲息環境の酸素分圧と呼吸様式との関係を明らかにするために組織化学的手法と生化学的手法を組み合わせ解析をすすめている。申請者らによってすでに、ほ乳動物の肺に寄生するウエステルマン肺吸虫には、酸素をもちいる好氣的呼吸鎖と酸素を使わない嫌氣的呼吸鎖を同一個体中で併せもつことが、虫体体壁から分離した Mit の解析によって明らかにされていたが、これがそれぞれの呼吸鎖をもつ 2 つの異なった Mit からなるのか、ひとつの Mit 中に好氣と嫌氣的呼吸鎖をもつ一種のハイブリッドタイプであるのか、については不明であった。本研究により肺吸虫の体壁には、機能的および形態的に異なった 3 種の Mit 集団がそれぞれ異なった組織に分布することが明ら

かになった。

すなわち、虫体体壁のもっとも外側のテグメント細胞にはシトクロム *c* オキシダーゼ活性染色 (CCO staining) で強く染まり、クリステの良く発達したサイズの小さな Mit (Tc Mit)、また、体壁内側のパランキマ細胞には CCO staining で染まるサイズの大きな Mit (Pc 1 Mit)、および、まったく染まらない Mit (Pc 2 Mit) を、それぞれ別個に含むふたつの細胞 Pc 1、Pc 2 がモザイク状に存在することが明らかになった。

蔗糖密度勾配遠心法による解析の結果、Tc および Pc 2 Mit はそれぞれ好氣的 Mit、嫌氣的 Mit と定義できた。このように好氣的 Mit と嫌氣的 Mit が組織特異的に分布しているのは、本虫の棲息環境へのユニークな、すぐれた適応と考えられ、好気から嫌気呼吸の転換機構、さらには Mit の生合成機構を解明するうえで非常に重要な知見が得られた。

マンソン裂頭条虫 *Spirometra erinaceieuropaei* は本来イヌ、ネコを終宿主とし、成虫はその腸管に寄生するが、その幼虫であるプレロセルコイド (plero.) が寄生する第二中間宿主には、変温動物のは虫類、ヒトをふくむほ乳類など多くのものができる。本条虫の Mit の形態および呼吸鎖については、成虫、plero. のいずれについても知見が少ない。plero. はほ乳類が宿主の場合、皮下組織に寄生する場合が多く、寄生部位の酸素分圧に対してどのように適応しているのか興味深い。本研究では、*S. erinaceieuropaei* の plero. および成虫の Mit を組織化学的手法によって in situ に観察し、両虫体組織には、シトクロム *c* 酸化酵素 (CCO) の活性染色により、弱く染色される Mit が存在することを明らかにした。さらに、plero. と成虫から

Mit 分画を調製し、密度勾配遠心法による解析を行った結果、plero. では CCO の比活性の高い Mit が低密度分画に分布するが、成虫では低密度分画における CCO の比活性は低く、高密度分画に NADH-フマル酸還元活性を有する Mit が分布することが明らかになった。本裂頭条虫ミトコンドリアについては、研究が終了しておらず、平成 25 年度も引き続き行う予定である。

#### 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 2 件)

① Shinzaburo Takamiya, Koich Fukuda, Takeshi Nakamura, Takashi Aoki, and Hiromu Sugiyama, International Journal for Parasitology, 査読有, Vol. 40, 2010, 1651-1658

② Shinzaburo Takamiya, Koich Fukuda, Takeshi Nakamura, Takashi Aoki, and Hiromu Sugiyama, XII International Congress of Parasitology ICOPA, 査読無, 2010, 129-133

[学会発表] (計 10 件)

高宮信三郎、中村 健、福田 孝一  
寄生蠕虫ミトコンドリアの呼吸鎖:

*Spirometra erinaceieuropaei* 成虫およびプレロセルコイドにおける比較解析 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日 福岡市福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

高宮信三郎、橋本宗明、藤村 務、上野 隆、山崎 浩 自活性線虫 *Caenorhabditis elegans* およびブタ回虫 *Ascaris suum* のシトクロム *b*<sub>5</sub> (様) 蛋白の比較解析: *C. elegans* F58B4. 2 は回虫分泌型シトクロム *b*<sub>5</sub> の偽遺伝子化したホモログである。第 72 回日本寄生

虫学会東日本支部会・第10回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会 2012年10月13日 前橋市 群馬大学医学部 刀城会館

高宮信三郎、橋本宗明、藤村 務、上野 隆、山崎 浩 自活性線虫 *Caenorhabditis elegans* の F58B4.2 は偽遺伝子化した回虫分泌型シトクロム  $b_5$  のホモログである 第6回蠕虫研究会 2012年7月28日 宮崎市 青島サンクマール

高宮信三郎、中村 健、福田 孝一 *Spirometra erinaceieuropaei* 成虫およびプレロセルコイドミトコンドリアの比較解析 第81回日本寄生虫学会大会 2012年3月23日 西宮市 兵庫医科大学 西宮キャンパス

高宮信三郎、中村 健、福田 孝一 *Spirometra erinaceieuropaei* プレロセルコイドおよび成虫ミトコンドリアの呼吸鎖 第71回日本寄生虫学会東日本支部大会 2011年10月1日 東京都 杏林大学

高宮信三郎、橋本宗明、藤村 務、上野 隆、山崎 浩 寄生線虫ブタ回虫シトクロム  $b_5$ : 自活性線虫 *C. elegans* シトクロム  $b_5$  との比較解析 第84回日本生化学会大会 2011年9月22日 京都市 京都国際会館

高宮信三郎、中村 健、福田 孝一 *Spirometra erinaceieuropaei* プレロセルコイドの呼吸鎖について 第5回蠕虫研究会 2011年7月30日 宮崎市 青島サンクマール

高宮信三郎、中村 健、福田 孝一 *Spirometra erinaceieuropaei* プレロセルコイドのミトコンドリア分画について 第80回日本寄生虫学会大会 2011年7月18日 東京

都 慈恵医科大学

Takamiya S, Fukuda K, Nakamura T, Aoki T, and Sugiyama H. *Paragonimus westermani*: mosaic distribution of aerobic and anaerobic mitochondria in their body. 第33回分子生物学会年会、第83回日本生化学会合同大会 2010年12月7-10日、神戸ポートアイランド

高宮信三郎、青木孝、福田孝一、中村健、杉山広、ウエステルマン肺吸虫は好氣的ミトコンドリアと嫌氣的ミトコンドリアをそれぞれ異なった細胞に持つ、第79回日本寄生虫学会大会 2010年5月20日 旭川市、大雪クリスタルホール

[図書] (計1件)

高宮信三郎 からだと酸素の事典 (分担執筆: 1.4 ミトコンドリアの歴史 pp38-52) 朝倉書店 (酸素ダイナミクス研究会編) 2009年 (総ページ数 583)

[その他]

高宮信三郎 ハイポキシア耐性動物にみられる低酸素適応機構 pp96-98 平成22年度 順天堂大学ハイテク・リサーチ・センター環境医学研究所紀要 2011年12月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高宮 信三郎 (TAKAMIYA SHINZABURO)  
順天堂大学・医学部・先任准教授  
研究者番号: 90138206

### (2) 研究分担者

藤村 務 (FUJIMURA TSUTOMU)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 70245778