

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590484

研究課題名(和文) 蠕虫嫌氣的ミトコンドリアキノール-フマル酸還元酵素の細菌発現系の開発

研究課題名(英文) Development of the expression system of helminthic mitochondrial quinol-fumarate reductase in bacteria.

研究代表者

坂元 君年 (SAKAMOTO, Kimitoshi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50361465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素に適応した蠕虫ミトコンドリアに特有の嫌気呼吸鎖の要であるキノール-フマル酸還元酵素(QFR)は好氣的ミトコンドリア複合体IIの逆反応を効率よく触媒することで特徴付けられる。この反応を可能にする酵素学的特徴を解明するために細菌での発現系構築を目指した。

発現を目的としたエキノコックスQFRに含まれるすべてのサブユニットの遺伝子をクローニングし、ミトコンドリア内でのアミノ酸N末端も決定した。発現宿主候補のRhodospirillum rubrumにおいて内在性の複合体II遺伝子を破壊も完了し、エキノコックスQFRを発現させるためのプラスミドを構築して発現の準備が整った。

研究成果の概要(英文)：Quinol-fumarate reductase (QFR) is the key enzyme for the anaerobic respiratory chain of hypoxia adapted helminthes. QFR is characteristic by its effective catalytic activity for the reverse reaction of aerobic respiratory complex II. In the aim of elucidating the mechanisms of enhancing reverse reaction, the development of expression system in bacteria was planned. At first, all the genes for the subunits of QFR from Echinococcus multilocularis were cloned. N terminal amino acid of them were also determined from the QFR in mitochondria. Complex II gene from the expression host, Rhodospirillum rubrum was knocked out. Finally, plasmid for expressing Echinococcus QFR was prepared.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：蠕虫 ミトコンドリア呼吸鎖

1. 研究開始当初の背景

申請者が申請当初所属していた研究室を主宰する北らにより、蠕虫の低酸素適応についてエネルギー代謝の観点からミトコンドリア呼吸鎖複合体 II が中心的な役割を果たすことがブタ回虫をモデルとした研究で明らかになっている (Kita *et al.* Electron-transfer complexes in Ascaris mitochondria 2002 *Adv. Parasitol.* 51, 95-131)。ブタ回虫生活環における酸素分圧の変化に伴う複合体 II の変遷については申請者も研究に参加し、研究を進展させてきた (Iwata *et al.* Change of subunit composition of mitochondrial complex II in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host 2008 *Parasitol. Int.* 57, 54-61)。

一方で、ブタ回虫で得られた嫌氣的呼吸鎖の特性が寄生性線虫に限定せず、蠕虫一般に適用出来るかどうかの情報はこれまではまったく無かった。そこで、申請者は実際に駆虫薬の求められているエキノコックスについて嫌氣的呼吸鎖の関与を調べるために北海道大学・獣医学部、北海道立衛生研究所との共同研究を開始し、エキノコックス原頭節からミトコンドリアを調製し呼吸鎖の解析を行った (Matsumoto *et al.* Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis 2008 *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 164-170)。その結果、嫌氣的呼吸鎖というシステムとしてはブタ回虫ミトコンドリアと同じ NADH-フマル酸還元系であることが分かったが、酵素活性や阻害剤感受性に関してブタ回虫がモデルとしては万能ではないことが明らかになった。ブタ回虫複合体 II については、材料入手の利点から申

請者らは X 線結晶構造解析にまで成功している (Osanai *et al.* Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with specific inhibitor, flutolanil 2009 *Acta Crystallographica Section F* 65, 941-944)。これまでに報告されている X 線回折による複合体 II の結晶構造は申請者らの回虫の例以外に、細菌で 4 種類、脊椎動物で 2 種類(ブタ、ニワトリ)あり、膜タンパク質の中では結晶化が容易なタンパク質であると言える。ミトコンドリア型の複合体 II の発現系をバクテリアで構築することが出来れば本研究の目的以外にも、ヒトを始めとする精製タンパク質の大量調製が困難な生物の X 線結晶構造解析への道が開ける。

2. 研究の目的

本研究はエキノコックスミトコンドリア呼吸鎖 QFR のバクテリア発現系構築が通過点であり第一の目的である。科学研究費の交付を希望する期間内には(1)エキノコックス QFR および複合体の組み立てに必要なアッセムブリーファクター遺伝子のクローニング、(2)エキノコックス複合体 II の発現用挿入遺伝子の作製、(3)バクテリア、*Rhodobacter capsulatus* および *Rhodospirillum rubrum* において安定発現可能な発現用プロモーターの選抜、(4)バクテリアでの機能的発現系の確立を目指した。

3. 研究の方法

α -プロテオバクテリアである *Rhodobacter capsulatus* および *Rhodospirillum rubrum* をエキノコックス QFR 発現用の宿主とする。エキノコックス QFR を構成する四つのサブユニット全てのクローニングおよびアッセムブリーファクター二つのクローニングを完了させ、発現用ベクターを作製する。発現用ベクターではバクテリア同様のオペロン構造となる

ように六つの遺伝子を配置するが、オペロン上の遺伝子の順番、遺伝子間の配列を最適化する。すでに内在性複合体 II をノックアウトした *R. capsulatus* 同様、*R. rubrum* の複合体 II のノックアウト株も作製する。培養条件や発現用プロモーターを複数検討することで安定して機能的にエキノコックス複合体 II が発現する条件を確立する。

4 . 研究成果

まず発現を計画したエキノコックス QFR 遺伝子のクローニングを行った。エキノコックス QFR は四つのサブユニットから構成されているが、鉄硫黄クラスターサブユニット *sdhB* には二つのアイソフォームがクローニングされた。また、成熟した QFR には含まれず酵素複合体のアセンブリーに参与していると考えられる *sdhA1*, *sdhA2* も含めて合計七つの遺伝子をクローニングした。*sdhB* の配列を他のバクテリア、ミトコンドリア由来の複合体 II と比較すると、極めて保存性が高いアミノ酸の一つが他のアミノ酸に置換していた。そのアミノ酸が一つの鉄硫黄クラスターの近傍に位置することからエキノコックス QFR の特異な反応性を反映しているものと考えられる。興味深いことに、発現宿主の第一候補である *Rhodospirillum rubrum* の複合体 II も同じアミノ酸の置換を持っていた。そこで *R. rubrum* の細胞膜を調製し NADH-フマル酸還元系の反応性を調べたところ、エキノコックス同様に NADH 酸化反応よりも高い活性を示した。これは蠕虫ミトコンドリア QFR のモデルとして *R. rubrum* 複合体 II が利用できる可能性を示した。また、*R. rubrum* および *Rhodobacter capsulatus* において複合体 II の KO 株を作製し、それぞれのバクテリアで互いの複合体 II を機能的に発現することに成功した。エキノコックス QFR については人工遺伝

子により *R. rubrum* にコドン最適化させた人工遺伝子を作製し、これをプラスミドに組み込んだ発現用プラスミドの作製が終了して、発現準備が整った。

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 5 件)

- (1) Mori M, Morimoto H, Kim YP, Ui H, Nonaka K, Masuma R, Sakamoto K, Kita K, Tomoda H, Shiomi K, Omura S. “Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389.” *Tetrahedron* 67 (2011) 6582-6586
- (2) Oda Y, Yui R, Sakamoto K, Kita K, Matsuura ET. “Age-related changes in the activities of respiratory chain complexes and mitochondrial morphology in *Drosophila*.” *Mitochondrion* 12 (2012) 345-351
- (3) Shimizu H, Osanai A, Sakamoto K, Inaoka D K, Shiba T, Harada S, Kita K. “Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*” *The Journal of Biochemistry* 151 (2012) 589-592
- (4) Saimoto H, Kido Y, Haga Y, Sakamoto K, Kita K. “Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*.” *The Journal of Biochemistry* 153 (2013) 267-273
- (5) Shiba T, Kido Y, Sakamoto K, Inaoka DK,

Tsuge C, Tatsumi R, Takahashi G,
Balogun EO, Nara T, Aoki T, Honma T,
Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Saimoto
H, Moore AL, Harada S, Kita K.

“Structure of the trypanosome
cyanide-insensitive alternative oxidase.”
*Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America*
110(2013)4580-4585

〔学会発表〕(計 3件)

- (1) 坂元君年・Hendri Aldrat・北潔：コ
ハク酸脱水素酵素複合体の異種生物
間発現系の開発. 日本農芸化学会東
北支部第 146 回大会(山形大学)、
2011 年
- (2) 坂元君年・Hendri Aldrat・北潔：紅
色光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus*
を用いたコハク酸脱水素酵素複合体
の異種生物間発現. 日本農芸化学会
2012 年度大会(京都女子大学)、2012.
- (3) 福士実咲・柴谷恵太・Hendri Aldrat・
北潔・Fevzi Daldal・坂元君年：
Rhodobacter capsulatus と
Rhodospirillum rubrum 間でのキメラ
型コハク酸 ユビキノン還元酵素の
作製. 第 86 回日本生化学会大会(パ
シフィコ横浜・横浜)、2013 年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂元 君年 (SAKAMOTO, Kimitoshi)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50361465