

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590494

研究課題名(和文)トキソプラズマ原虫に特異的なGTP-PKの基質供給経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the substrate supplying system in *Toxoplasma gondii* specific GTP-PK

研究代表者

浅井 隆志 (ASAI, TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30159355

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)：トキソプラズマのミトコンドリアとアピコプラストには生理的役割が不明なピルビン酸キナーゼIIが存在する。この酵素の役割を知るためにその基質供給系を検討した。まずPEPCKの遺伝子組み換え体(合計2種類)を作製する実験を行った。遺伝子組み換え体はPCR法によりトキソプラズマRH株のcDNAより増幅し、発現ベクターであるpGEX系に挿入する方法を最初に行った。最後に低温で発現を行うpCold TFベクター系でのPEPCKとの融合タンパク質の発現に成功した。II型のPEPCKは全く検出されなかったが、PCR装置、Taqポリメラーゼ、アニーリング温度を変換するなどの検討を行い、検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：A pyruvate kinase II in mitochondria and apicoplast of *Toxoplasma gondii* has not been known its physiological function. To understand the physiological function of this enzyme, the substrate supplying system of this enzyme was investigated. For the first time, a production of two recombinant PEPCKs was studied. The genes of enzymes were produced by PCR using a cDNA of RH strain of *T. gondii* and reconstituted into a protein producing plasmid pGEX. Type I gene of PEPCK was recognized, however, type II gene was completely unrecognized. After several trials to other protein producing plasmid (pET etc.), we found that pCold TF plasmid producing a protein at low temperature could produce the type I recombinant PEPCK as a GST-fusion protein. Since type II PEPCK gene could not be obtained by PCR, we tried several PCR techniques (Taq polymerase, annealing T_m, thermal cycler, etc.). Finally, type II gene was obtained.

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：トキソプラズマ ピルビン酸キナーゼII ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ症は我が国をはじめとして世界中に分布する日和見感染症であるが、発病後は重篤な症状を示しその治療ははなはだ難しい。現在、エイズ患者や臓器移植患者の増加に伴い発症頻度の増加がみられる。既存の治療薬は治療効果が低く、特効性の高い新規治療薬の開発が求められている。現在トキソプラズマ原虫の全遺伝子塩基配列が明らかになり、遺伝子のノックアウトやタンパク質のオーバープロダクションなど遺伝子操作を加えた研究が盛んである。そのため酵素の反応調節など基本的なタンパク質の機能に関する研究はあまり行われていない。その原因は、バクテリアやほ乳類で蓄積された酵素に関する情報が膨大にあり、寄生原虫でも同じ反応を行う酵素はバクテリアやほ乳類の酵素と基本的に同じだと思われるからである。

我々はこのような状況下で糖代謝に関連した研究を行ってきた。糖代謝の研究は生化学の勃興期に盛んであったことから、すでに終わった研究であり、今更研究する価値があるのかといった意見を聞くことが多々ある。たしかにほ乳類、イースト、細菌などでは詳細な研究が行われており代謝調節機構における新たな発見はあまり期待できないかもしれない。しかし細胞内寄生という特殊な環境に適応した生物であるトキソプラズマは、他の生物と同じ代謝調節機構ではなく未知の調節機構で糖代謝を行っているという考えに至った。その根拠は、これまでの研究でトキソプラズマとその近縁の原虫にのみ存在するNTPaseを発見したことに起因している。NTPaseの存在はトキソプラズマが細胞内に寄生するために既知の代謝経路とは全く異なる未知の経路を持っていることを示している。高エネルギー化合物であるNTPの代謝にリンクした特殊な代謝経路が存在するはずである。しかしトキソプラズマは虫体を大量に得ることが困難であったため生化学研究の材料としては難があり、各種の代謝に関連した酵素の性質は網羅的に調べられていない。最近トキソプラズマ遺伝子の全塩基配列が明らかとなりようやく各種の酵素の性質を調べる環境が整ってきた。我々が糖代謝の重要酵素を調べたところ、低濃度のグルコースに適応していること (Saito et al. *Int. J. Parasitol.* 2002;

32(8): 961-967) や、解糖系の最初の産物であるグルコース6リン酸が解糖系終盤の酵素であるピルビン酸キナーゼをアロステリックに活性化すること (Maeda et al. *Parasitol. Res.* 2003; 89: 259-265) を見出した。これらの結果を総合すると、トキソプラズマの糖代謝は非常に単純な調節機構であることがわかった。しかしなんと言っても最大の発見は、GDP-依存性のピルビン酸キナーゼが存在することに気づいたことである。我々が先に調べたピルビン酸キナーゼの他に、役割が不明な新規の酵素であることが判明した。この酵素はミトコンドリアとアピコプラストに存在し、特異な酵素学的性質を有している (Saito et al. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(20): 14041-14052)。GDP-依存性ピルビン酸キナーゼは今まで知られていない新規の酵素である。ミトコンドリアに存在するピルビン酸キナーゼは殆どの生物で報告されていない。トキソプラズマの生活史の上で最も研究に用いられるタキゾイト型虫体以外の形態で発現されていると考えた。しかしこの酵素はタキゾイト型虫体で発現されており、しかもミトコンドリアに存在することが判明した。ミトコンドリアの不明の代謝系とリンクしていることが考えられる。免疫細胞組織学の検討で、この酵素はミトコンドリア以外の細胞内小器官にも存在する図が得られ、我々はアピコプラストにも存在すると考えた。我々はアピコプラストのマーカーを持ち合わせていなかったため、米国ペンシルバニア大学生物学部のDavid S. Roos博士との共同研究を行い、アピコプラストにも存在することを確認した。この酵素に関して研究を行っている国内・国外のグループは我々だけである。GDP-依存性や高pH領域での反応など意外性が重なり、その基本的性質を見極めることに手間取りようやく第一報目の論文を発表したところである (Saito et al. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(20): 14041-14052)。またマラリア原虫ではアピコプラストにのみ近縁の酵素の存在が明らかとなった (Maeda et al. *Parasitol Int.* 2009; 58: 101-105)

以上の結果を踏まえ、GDP-依存性のピルビン酸キナーゼの基質供給源を確立す

るための実験を行った。

2. 研究の目的

GDP-依存性ピルビン酸キナーゼの反応に必要な基質、特にホスホエノールピルビン酸 (PEP) の供給がどのように行われているのかを研究期間内に決定する。この事はこの酵素の役割を解明するのに重要な情報となる。PEP を供給する経路としてはミトコンドリア内への輸送経路が考えられるが、そのような経路は見つかっていない。現在考えられるのはホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) による供給である。

トキソプラズマには2種類のPEPCKが存在することが知られている。研究期間内にこれらの酵素の細胞内分布を確定し、PEP の供給が可能か決定することを目的とした。

3. 研究の方法

トキソプラズマにおけるPEPの合成酵素はエノラーゼとホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) が検出される (<http://www.toxodb.org/toxo/home.jsp>)。

これらの酵素はそれぞれ二種類のアイソザイムが存在する。もし外部からPEPの供給がミトコンドリアに無ければ、ミトコンドリア内でこれらのいずれかの酵素が働いていることが考えられる。しかしエノラーゼに関しては詳細な細胞内分布がすでに報告されている (Ferguson et al. *Int. J. Parasitol.* 2002;32(11):1399-1410)。この報告によれば、アイソザイム酵素が核に存在することが知られており、GDP-依存性ピルビン酸キナーゼの基質を供給しているとは考えられない。もちろん全く未知の酵素の存在も考えられるが、PEP関連遺伝子の存在は上記以外には認められない。また前述のごとく、PEPのトランスポーターが存在しないことから、まず手がかかりとなる実験としてPEPCKの遺伝子組換え体 (合計2種類) を作製する。遺伝子組換え体はPCR法によりトキソプラズマRH株のcDNAライブラリーより増幅し、発現ベクターであるpGEX系に挿入する。遺伝子情報はすべてトキソプラズマのデータベースより入手可能である。我々の教室では、現在8種類のトキソプラズマ酵素をpGEX系で発現させているが、その内7種類の酵素は活性のあるものが得られている。活性の無い1種類も大量にインクルージョンボディで発現されてお

り、pGEX系は良い結果をもたらしている。酵素活性の有無に拘わらず発現された酵素は精製し抗体を作製する。

4. 研究成果

PEPCK の遺伝子組み換え体 (合計2種類) を作製する実験を行った。遺伝子組み換え体はPCR法によりトキソプラズマRH株のcDNAより増幅し、発現ベクターであるpGEX系に挿入する方法を最初に行った。しかし、I型のPEPCKは簡単に検出可能であったが、II型のPEPCKは全く検出できなかった。またI型のPEPCKはpGEX系では発現できないことも判明した。そこでまずI型のPEPCKの発現系を確立するために各種の発現ベクター系 (pET系など) の検討を行った。しかし通常の発現系は機能せず、結局、低温で発現を行うpCold TFベクター系でのPEPCKとの融合タンパク質の発現に成功した。ただこの融合タンパク質は生成が難しく、融合タンパクを切り離れたPEPCKだけの精製には至っていない。最終的にはPEPCK-融合タンパク質を生成して、これを抗原とした実験に取りかかる予定である。

II型のPEPCKは全く検出されなかったが、PCR装置を替え、Taqポリメラーゼを替え、アニリング温度を変換するなどの検討を行ったところ、ようやく検出に成功した。こちらのPEPCKは現在pGEX系への挿入を行っている。

当初予定した実験結果は得られていないが、ようやく2種類のPEPCKの遺伝子組み換え体の作製に成功した。発現ベクター系と検出PCR系が予想した以上に難解であったことが原因である。

トキソプラズマのピルビン酸キナーゼIIは解糖系の酵素ではなく全く新しい代謝経路に関連した酵素であると思われる。この酵素を発見したのは我々であり、国内外でこの酵素について研究しているグループは現在存在しない。ただ特異な酵素であることから今後は海外の研究者が各種の研究を開始することが予想される。

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6件)

- 1) Mikita K., Maeda T., Ono T., Miyahira Y., Asai T., Kawana A.
The utility of cerebrospinal fluid for the molecular diagnosis of toxoplasmic encephalitis (査読あり)
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 75, 155-159 (2013)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobiol.2012.10.015>
- 2) 浅井隆志

- トキソプラズマ脳炎の PCR 検査法 (査読なし)
Clin Neuro 53,297-298 (2013)
<http://www.neurology-jp.org/>
- 3) 浅井隆志
感染症症候群 (第 2 版) 鞭虫症 (査読なし)
別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ、
24,710-711(2013)
0047-1852/13/¥60/頁/JCOPY
- 4) 浅井隆志
感染症症候群 (第 2 版) 蟻虫症 (査読なし)
別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ、
24,712-714(2013)
0047-1852/13/¥60/頁/JCOPY
- 5) 浅井隆志
抗寄生虫薬 (査読なし)
感染症診療実践ガイド
Medical Practice 28,157-165 (2011)
<http://www.bunkodo.co.jp>
- 6) 浅井隆志
寄生虫感染症 (査読なし)
感染症診療実践ガイド
Medical Practice 28,498-505 (2011)
<http://www.bunkodo.co.jp>

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 浅井隆志
海外渡航において注意すべき寄生虫症
日本環境感染学会
2014 年 2 月 14 日 東京
- 2) 出口翔平、浅井隆志、他 4 名
トキソプラズマ原虫由来ピルビン酸キナーゼ II の結晶学的研究
日本生化学会
2013 年 9 月 11-13 日 横浜
- 3) 浅井隆志
トキソプラズマ脳炎の PCR 検査法
日本神経学会
2013 年 5 月 31 日 東京
- 4) 前田卓哉、浅井隆志、他 12 名
我が国におけるトキソプラズマ症の現状と問題点
日本寄生虫学会
2013 年 3 月 31 日 東京
- 5) 浅井隆志、坪井絵莉子、今田美穂子、神川龍馬、橋本哲男
トキソプラズマのミトコンドリアでの PEP 供給源の検索
日本寄生虫学会
2012 年 3 月 22 日 兵庫県西宮市

〔図書〕(計 2 件)

- 1) Coppens I., Asai T., Tomavo S.
Academic Press (Weiss L. M and Kim K. 2nd Eds)
Toxoplasma gondii Chapter 8;
Biochemistry and Metabolism of
Toxoplasma gondii: Carbohydrates,

- Lipids and Nucleotides
255-288(2013)
- 2) 浅井隆志、田邊将信、小林正規
医動物検査 (2 臨床形態検査)
Medical View 174-205 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
浅井 隆志 (ASAI , TAKASHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 30159355
- (2)研究分担者
今田 美穂子 (IMADA , MIHOKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号 : 50445201
- (3)連携研究者
なし