

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460519

研究課題名(和文) 異環境に棲息する寄生蠕虫ミトコンドリア呼吸鎖のプロテオーム解析

研究課題名(英文) Proteomic analyses of mitochondrial respiratory chains from parasitic helminths inhabiting various tissue environments

研究代表者

高宮 信三郎 (Takamiya, Shinzaburo)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：90138206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は異なった組織環境に生息する寄生蠕虫を用いて、酸素分圧に応答するミトコンドリア蛋白群、とくに呼吸鎖蛋白の発現制御を網羅的に解析することにより、その感染成立、維持機構の一端を解明することを目的とした。インゲル消化を伴う二次元電気泳動およびショットガン法により、嫌氣的な宿主腸管に棲息する回虫と好氣的自活性線虫 *Caenorhabditis elegans* のミトコンドリア蛋白を質量分析計により比較解析したところ、それぞれの線虫に特徴的な蛋白プロファイルが得られた。皮下組織に寄生する Manson 裂頭条虫幼虫は肺吸虫と同様、好氣と嫌氣の両ミトコンドリアを有することが明らかになった。

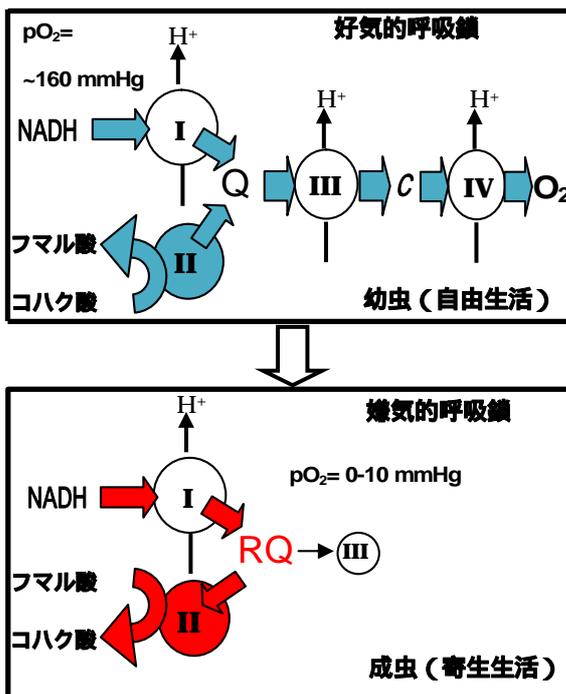
研究成果の概要(英文)：Using parasitic helminths inhabiting various tissue environments, this research project was undertaken to elucidate underlying mechanisms for their infectious establishment and maintenance by analyzing expression and regulation of mitochondrial proteins, especially respiratory chains, responding to changing oxygen tension. Comparative mass spectrometric analyses, using 2D-PAGE followed by in-gel digestion and shotgun method, of mitochondrial proteins of *Ascaris suum* adult and *Caenorhabditis elegans* dwelling in anaerobic host intestine and free-living under aerobic conditions, respectively, revealed that the protein profiles were characteristic of the respective nematodes. The larva of *Spirometra erinaceieuropaei* living under dermal tissues, like *Paragonimus westermani*, was shown to possess both aerobic and anaerobic mitochondria.

研究分野：生化学、分子細胞生物学

キーワード：寄生蠕虫 低酸素適応 呼吸鎖 シトクロム b5 ミトコンドリア プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

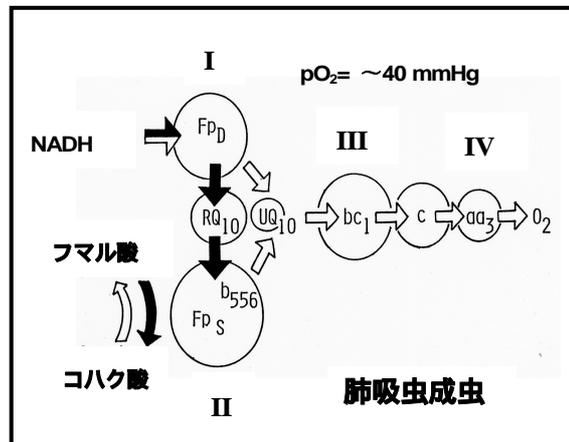
申請者はおもに回虫 (*Ascaris suum*) をもちいて、寄生適応という観点から、エネルギー生成系の中心的細胞内器官であるミトコンドリア (以下 Mit) の呼吸鎖に着目し研究をすすめてきた。これまでの研究から、寄生蠕虫は宿主哺乳動物とは異なり、棲息環境の酸素分圧の高低に応じて酸素を用いる好氣的呼吸と、酸素を必要としない嫌氣的フマル酸呼吸を切り換え、調節してエネルギー生成を行うこと (呼吸適応) が明らかになってきた (Takamiya et al. Biochim. Biophys. Acta 1993, Amino et al. Mol. Biochem. Parasitol. 2003)。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 (下図参照、Q: ユビキノン; RQ: ロドキノン; I, II, III, IV: それぞれ電子伝達複合体 I, II, III, IV; プロトンと矢印はプロトンポンプ活性: ATP 産生部位)。



また、Mit 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)。

さらに申請者らは回虫の研究と平行して、腸腔 (0-10mmHg) より酸素分圧が高い肺 (~40mmHg) に寄生するウエステルマン肺吸虫 (*Paragonimus westermani*) の Mit を単離、解析し、肺吸虫は上記の好氣的呼吸鎖と嫌氣的呼吸鎖を1個体のなかで併せもつことを明らかにした (下図, 黒矢印: 嫌氣呼吸; 白矢印: 好氣呼吸; UQ₁₀: ユビキノン 10; RQ₁₀: ロドキノン 10; Fp: フラビン蛋白; b, bc₁, c, aa₃: シトクロム類, Takamiya et al. Arch. Biochem. Biophys. 1994)。



この知見は上述の呼吸転換に棲息環境の酸素分圧が決定因子として働くことを示すとともに、肺吸虫の呼吸鎖が呼吸転換の遷移状態であり、酸素のあるときは好氣呼吸を、酸素のないときは嫌氣呼吸を行う、条件嫌氣的 Mitであることを示したものである。

その後の研究により、本“条件嫌氣的”Mit は、好氣と嫌氣的の呼吸鎖成分を併せ持つ単一の Mit 集団ではなく、好氣的 Mit と嫌氣的 Mit の混合したもので、それぞれ肺吸虫一個体内の体表のテグメント細胞、および体内内部の内実細胞に組織特異的に発現していることが明らかになった (Takamiya et al. Int. J. Parasitol. 2010)。

このように宿主体内のさまざまな組織に寄生する蠕虫の呼吸鎖を系統的に解析することは本研究の目的である呼吸転換の分子機構を解明するうえで、回虫の系では得難い、優れたアプローチであるとの着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、ウエステルマン肺吸虫およびマンソン裂頭条虫(*Spirometra erinacei-europaei*)を組織寄生蠕虫のモデルとして用い、宿主体内のさまざまな環境因子のなかで、生存に必須なエネルギー生成系に重要な影響をおよぼす酸素分圧に注目して、これに応答する蛋白群の発現制御を包括的に解析することによって、組織寄生蠕虫症の感染成立、維持機構の一端を解明することを目的とする。寄生蠕虫は、宿主体内に侵入後、さまざまな組織に寄生するが、その棲息環境の酸素分圧は組織によって著しく変化する。寄生蠕虫は変化する酸素分圧に適応して生存するが、その適応機構は明らかではない。本研究では、それぞれ肺と皮下組織に寄生する、上記蠕虫類を用いて、エネルギー生成系の中心的オルガネラである Mit に焦点をしばり、その包括的プロテオーム解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 生物材料：マンソン裂頭条虫のプレロセルコイド、ウエステルマン肺吸虫のメタセルカリアはそれぞれシマヘビ、サウガニから採集した。回虫成虫は東京食肉市場株式会社から得た。自活性線虫 *Caenorhabditis elegans* は研究室で継代維持されているものを用いた。肺吸虫成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。

(2) 実験方法： Mit の単離および形態・機能解析：Mit はホモジェネートを遠心分画し、得られた Mit 分画をさらにショ糖あるいは

はナイコデントの密度勾配遠心により精製した。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-フマル酸還元酵素活性をはじめ呼吸酵素活性は二波長分光光度計を用いて分光学的に測定した。Mit による酸素消費量および過酸化水素の生成量は、それぞれクラーク型の酸素電極および蛍光分光光度計を用いて測定した。また、Mit の形態は透過型電子顕微鏡で観察し、組織化学的手法のシトクロム酸化酵素活性染色法により、内膜の染色密度の大小を比較した。Mit 中のキノン成分は HPLC を用いて同定、定量した。Mit プロテオーム解析：二次元電気泳動については、一次元は pH 3-10 の勾配をもつ等電点電気泳動 (IPG strip 11cm)、二次元は 10% のポリアクリルアミドゲル (16.5 cm x 16.5 cm) の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、泳動後銀染色で蛋白スポットを検出した。分離した各蛋白スポットは等電点、分子量を検量線により決定後、メス刃で切り出し、トリプシンによる in-gel 消化を行い、消化物を抽出、質量分析計で分析した。シトクロム *b*₅ に関する in silico 解析：NCBI の PDB から、種名のフルネームおよび cytochrome b5 を入力して検索、回収された配列のうち Cytb₅ モチーフの HPGG を有するもの (融合蛋白型は除く) を GENETEX-MaC(ver.12) および CLUSTALW in MEGA 6.0 を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) マンソン裂頭条虫 Mit の呼吸鎖：
マンソン裂頭条虫 *Spirometra erinacei-europaei* (以下 *S. e.*) は、本来イヌ、ネコを終宿主として、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 (pleroc.) が寄生する第二中間宿主 (待機宿主) には、変温動物であるは虫類およびヒトをふくむほ乳類など多くの動物がなることができる。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機会が多く, 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不明であった。 plero. および成虫Mitの比較: plero. Mitを組織化学的手法によってin situに観察した。さらに, plero.と成虫からMit分画を調製し, 両者の呼吸酵素活性およびキノンを定量, 比較解析した。その結果, plero. 組織には, シトクロム c 酸化酵素の活性染色により, 弱く染色されるMitが存在することが明らかになった。 plero. および成虫Mitはいずれもロドキノン-10とユビキノン-10 を含み, ロドキノンが主成分であった。キノンの総量は plero.と比べて成虫のほうが多く, Mit蛋白あたり, plero. の約6.2倍の含量であった。また, ユビキノンに対するロドキノンの比 (RQ_{10}/UQ_{10}) は plero. Mit, 成虫Mitでそれぞれ 4.9, 30.5 の値であった。キノン成分の解析において特筆すべきは, plero.Mit において, これまで蠕虫のキノン解析では観察されたことのない, HPLCクロマトグラム上 275-280 nmに吸収を有するユビキノン, ロドキノン以外の成分 Xが検出されたことである。本成分に関しては今後さらに検討する予定である。成虫のNADH-フマル酸還元活性の比活性は plero. の約25倍の値を示した。次に, 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。これは本条虫においても好気と嫌気のMitが組織特異的に発現していることを示唆している。好気条件下における過酸化水素生成: 本条虫の垂Mit画分は過酸化水素を生成することが示唆されていた。本研究では, Amplex -HRP系をもちいてその生成活性を定量した。コハク酸を基質にした場合,

0.272nmol/min/mg の値が得られ, コハク酸依存性の酸素消費活性 (2.08nmol/min/mg) の約1/10の比活性であった。同様に腸管に寄生する回虫について調べたところ, 回虫では 26.0 nmol/min/mg であり, *S.e.*成虫の約10倍の値を示し, 回虫の酸素消費活性の約1/2であった。*S.e.*成虫Mit分画には, 回虫成虫と同様NADH依存性の酸素消費と過酸化水素生成が観察されたが, 酸素消費活性はフマル酸存在下では抑制され, 過酸化水素は検出されなかった。

以上の結果をまとめると, a) 中間宿主の皮下組織に寄生する *S. e. plero.*のMit呼吸鎖は, ロドキノンが主成分であり, すでに嫌氣的である。b) 終宿主腸管に生息する成虫のMit呼吸鎖は plero.のMit呼吸鎖と比べて嫌氣的呼吸活性が 25 倍に上昇する。このような劇的な変化は, 生息環境の酸素分圧の変化に適応していると考えられる。c) 非生理的な好気条件下では回虫と同様, 電子がリークして過酸化水素を生成することが明らかになった。

(2) 回虫および *C. elegans* Mit蛋白の比較プロテオーム解析: 回虫Mitの呼吸鎖成分の分子特性については一部解明されているものの, Mit蛋白の全体像については未だ知見が少ない。一方, 通常の大気圧下, 振とう培養により得た *C. elegans*由来のMitは, その呼吸鎖成分において, ユビキノンを主要成分に含むがロドキノンも一部含むなど, 回虫感染幼虫由来のMitと酷似している。従って遺伝情報解析が先行し, 同じ線虫類である *C. elegans*のMitは回虫Mit蛋白の解析上良いコントロールになると考えられ, 申請者らは同時に解析してきた。大腸菌を餌として, 大量振とう培養して得た *C. elegans* から, Mitを高純度に精製, それを用いてプロテオーム解析を行い, 回虫成虫Mitと比較した。

Mit調製に先立ち, プロテオーム解析にふさわしい, 餌の大腸菌などが混入しない生き

の良い虫体の大量収集法を考案した。調製したMitは二次元SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(2D-SDS-PAGE)で展開し、銀染色後、染色領域を切り出し、トリプシンによるin-gel消化後、質量分析計で解析した。ショットガンではMitをウレア存在下可溶化後、トリプシンで消化して解析した。*C. elegans*では2D-PAGEで137の、ショットガン法では499の蛋白が検出された。回虫成虫については2D-PAGEの各スポットは解析中であるが、ショットガンでは370の蛋白が検出された。両Mitの2D-PAGEの銀染色プロフィールは著しく異なり、回虫では分子量約3万、4万付近の蛋白が濃く染められていた。線虫類Mitの二次元電気泳動による蛋白プロファイリング、マッピングは世界的に例がなく、とりわけ回虫成虫Mit蛋白のマッピングは嫌氣的Mitのスタンダードとなるものと期待され、その学術的インパクトは極めて大きいと思われる。

(3) 分泌型シトクロム b_5 の線虫類における分布：シトクロム b_5 (Cyt b_5)は、N末端側のヘム結合領域とC末端側に疎水性の膜結合領域をもつ膜蛋白型、ヘム結合領域のみをもつ可溶性型、ヘム結合領域と他の酵素が融合した融合蛋白型の3型からなるCyt b_5 ファミリーを形成し、生物界にひろく分布している。

申請者らはすでに回虫*Ascaris suum* (As)成虫体壁から可溶性のCyt b_5 を見だし、そのユニークな分子特性、結晶構造を明らかにするとともに、低酸素適応における生理機能について解明してきた。As Cyt b_5 は上述の3つの型のうち、膜結合領域を欠いた可溶性型であるが、N末端側に30のアミノ酸残基からなるプレシークエンスをもつ分泌蛋白である。また、他種Cyt b_5 がほとんど酸性蛋白であるのに対して本Cyt b_5 は塩基性蛋白である。As Cyt b_5 は成虫特異的に発現し、体壁組織および体腔液の両者に分布、NADH-メトミオ(ヘモ)グロビン還元系の一員として、ミオ(ヘモ)グロビンの酸素結合能を回復させると同

時に、有害な余剰酸素を除去するという低酸素適応上、重要な機能をもつことを明らかにした。これまでの研究から、As Cyt b_5 に相当する分子をコードする遺伝子は自活性線虫*C. elegans*も保有しているが、RT-PCRの結果、イントロンが挿入されたRNAのみ検出され、蛋白として発現していないことが明らかとなった。当初、偽遺伝子とみなしたが、後にプロセスされていないmRNAであることが判明した。

本研究ではAsも含め、ゲノムが開示された寄生線虫とくに、Asと同様な腸管寄生線虫、およびAsとは寄生環境が異なる組織寄生フィラリア線虫由来Cyt b_5 ホモログについて、in silicoで解析し、分泌型の有無およびその系統関係を明らかにすることを目的とした。その結果、Asについては本分泌型Cyt b_5 の他にいずれも酸性蛋白である3種、すなわち、2つの膜結合型As Cyt b_5 1およびAs Cyt b_5 2、1つの可溶性型As Cyt b_5 3のホモログが同定された。検索した4種の腸管寄生線虫のうちネズミ糞線虫*Strongyloides ratti*については、Asと同様計4つのホモログが同定され、そのうちの1つは塩基性蛋白であり、系統樹ではこれのみがAsCyt b_5 と同じクレードに属した。他の3種の組織寄生フィラリア線虫には2~3種のホモログが同定されたが、いずれも酸性蛋白であり、AsCyt b_5 に相当するものは見出されなかった。

回虫の分泌型のシトクロム b_5 、As Cyt b_5 に相当する分子が昆虫媒介性で組織寄生線虫フィラリアには見出されず同じ土壌媒介線虫で腸管寄生の*S. ratti*に存在することは本分子が腸管という低酸素環境に適応する過程で特化された分子であるという仮説を支持する。

(4) ウエステルマン肺吸虫Mitのキノン定量：背景の項で一部述べたように、これまでの研究で本肺吸虫成虫のMitは好氣的呼吸鎖を有する好氣的Mitと嫌氣的呼吸鎖を有する

嫌氣的 Mit が別個に存在し、それぞれ組織特異的に発現していることを明らかにした。この知見はシヨ糖密度勾配遠心で比重の軽く、しかも好氣的呼吸鎖活性が高い Mit と、比重が重く、且つ嫌氣的呼吸鎖活性が高い Mit に分離されたことにより証明されたが、両 Mit 内のユビキノンとロドキノンの分布と呼吸活性との因果関係は明らかではなかった。そこで両 Mit のロドキノン (RQ) に対するユビキノン (UQ) の含量比 (UQ/RQ) および嫌氣的呼吸鎖活性 (フマル酸還元活性: FRD) に対する好氣的呼吸鎖活性 (シトクロム酸化酵素活性: COC) の比 (COC/FRD) を調べたところ、比重が軽い Mit は、重い Mit と比べて UQ/RQ 比が大きく、COC/FRD 比も大きいことが明らかになった。この結果は、本肺吸虫においても、ロドキノンおよびユビキノンがそれぞれ嫌氣的呼吸鎖と好氣的呼吸鎖の成分として機能していることを示している。

(5) 結論: 寄生蠕虫は線虫、吸虫、および糸虫に関わらず、その Mit 呼吸鎖は生活上遭遇する生息環境の酸素分圧に応じて、好気および嫌氣的フマル酸呼吸を行うことが示された。

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 4 件)

1. Shinzaburo Takamiya, Toshihiro Mita
Large-scale purification of active liquid-cultured *Caenorhabditis elegans* using a modified Baermann apparatus. *Parasitol. Int. Part B Current Manual for Parasitological Research* 査読あり **65** (2016) 580-583
<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.03.013>
2. Shinzaburo Takamiya, Muneaki Hashimoto, Toshihiro Mita, Takehiro Yokota, Yoshitaka Nakajima, Fumiyuki Yamakura, Shigetoshi Sugio, Tsutomu Fujimura, Takashi Ueno, Hiroshi Yamasaki
Bioinformatic identification of cytochrome *b₅* homologues from the parasitic nematode *Ascaris suum* and the

free-living nematode *Caenorhabditis elegans* highlights the crucial role of *A. suum* adult-specific secretory cytochrome *b₅* in parasitic adaptation. *Parasitol. Int.* 査読あり **65** (2016) 113-120

<http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.11.004>

3. Shinzaburo Takamiya

Reflection: How parasitic helminthes adapt to environmental hypoxia: My wanderings in helminth biochemistry. *Juntendo Medical Journal* 査読あり **60** (2014) 432-448

[学会発表](計 10 件)

1. 高宮信三郎, 数野彩子, 峯木礼子, 三浦芳樹, 美田敏宏 *Ascaris suum* *Caenorhabditis elegans* ミトコンドリアのプロテオーム解析: 二次元電気泳動法とショットガン質量分析法
第 86 回日本寄生虫学会大会 2017 年 5 月 29 日 北海道大学 学術交流会館 札幌
2. 高宮信三郎, 中村 健, 藤村 務, 上野隆, 福田 孝一, 美田敏宏 異なった環境に棲息する寄生蠕虫呼吸鎖の生化学的解析: *Spirometra erinaceieuropaei* ミトコンドリア呼吸鎖 第 7 回蠕虫研究会 2013 年 11 月 15 日 神奈川県 藤沢市 KKR 江の島ニュー向洋

[図書](計 5 件)

1. 高宮信三郎, 藤村 務, 峯木礼子, 高ひかり, 進藤典子, 美田敏宏 ワンステップオルガネラ分画法を用いた線虫ミトコンドリアの調製: ミトコンドリアプロテオーム解析にむけて pp.147-151 三恵社 寄生虫学研究 材料と方法 2014 版 総 179 ページ

[その他]

ホームページ

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/labokiseityu/takamiya>

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・非常勤講師
研究者番号: 90138206

(2) 研究分担者

藤村 務 (FUJIMURA, Tsutomu)
順天堂大学・医学研究科・客員准教授
研究者番号: 70245778