

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670205

研究課題名(和文) 寄生原虫トリパノソーマの解糖系酵素はなぜペルオキシソームに局在するのか

研究課題名(英文) Why does glycolysis take place in peroxisomes in trypanosomes?

研究代表者

奈良 武司 (Nara, Takeshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40276473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：寄生原虫トリパノソーマを含むキネトプラスチダ類は、解糖系10酵素のうちの初段7酵素を含む特殊化ペルオキシソーム、グリコソームを持ち、これは病原性の発現に必須である。本研究によって、グリコソームが捕食性の自由生活生物ディプロネマ類とキネトプラスチダ類の共通祖先で成立し、その後キネトプラスチダ類では宿主体内に豊富なグルコースを好適炭素源とする代謝基盤を、ディプロネマ類では被補食生物の主要炭素源であるアミノ酸を中心とするユニークな糖代謝基盤を確立したことが明らかとなった。すなわち、解糖系のペルオキシソーム移行は寄生適応のみならず、補食という生活様式においても有利に働いたことを示している。

研究成果の概要(英文)：The remodelling of organelle function is increasingly appreciated as a central driver of eukaryotic biodiversity and evolution. Kinetoplastids including Trypanosoma and Leishmania have evolved specialised peroxisomes, called glycosomes. Glycosomes uniquely contain a glycolytic pathway as well as other enzymes, which underpin the physiological flexibility of these major human pathogens. The sister group of kinetoplastids are the diplomonads, which are among the most abundant eukaryotes in marine plankton. Here we demonstrate the compartmentalisation of gluconeogenesis, or glycolysis in reverse, in the peroxisomes of the free-living marine diplomonad, Diplonema papillatum. Our results suggest that peroxisome modification was already underway in the common ancestor of kinetoplastids and diplomonads, and raise the possibility that the central importance of gluconeogenesis to carbon metabolism in the heterotrophic free-living ancestor may have been an important selective driver.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トリパノソーマ 解糖系 ペルオキシソーム オルガネラ進化 ディプロネマ

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物は多様なオルガネラを発達させ、各オルガネラは独自の代謝系を持つ。一方で、代謝経路の細胞内局在は進化上極めて保守的である。オルガネラ局在性の代謝経路は基本的に共生体起原で(ミトコンドリアのTCA回路や呼吸鎖など)、必須代謝経路の二次的なオルガネラ移行は原則起こらない。その理由は明快で、経路の一部の酵素が別のオルガネラに隔離されると経路の途絶(=死)を招くからである。その唯一の例外が、寄生原虫トリパノソームを含むキネトプラスチダ類の特殊化ペルオキシソーム、グリコソームである。グリコソームは解糖系10酵素のうち初段7酵素に加え、ペントースリン酸経路、ピリミジン生合成経路、プリン再利用経路などの、他生物では細胞質局在性の必須代謝経路を隔離している。グリコソームに局在するタンパクはペルオキシソーム移行シグナル(PTS)を持つため、本来多様な物質の酸化を担う場であったペルオキシソームが代謝経路の二次的移行という特殊な進化を経てグリコソームへと進化したと考えられる。

キネトプラスチダ類はユーグレノゾア生物群に属し、ユーグレナ類が最初に分岐する。ユーグレナ類には通常のペルオキシソームが存在するので、グリコソームはユーグレナ類の分岐以降に成立したことになる(図1)。キネトプラスチダ類の姉妹系統群ディプロネマ類はごく最近になって海洋プランクトンの主要な真核生物の一群であることが明らかとなったが(Science 348, 2015)、これまで生物学的解析は全く進んでこなかった。そこで我々はディプロネマ *Diplonema papillatum* に着目し、解糖系第4酵素アルドラーゼ(FBPA)がPTSを持ち、ペルオキシソームに局在することを明らかにした。これは、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の共通祖先において解糖系酵素の移行が起きた可能性を強く示唆している。

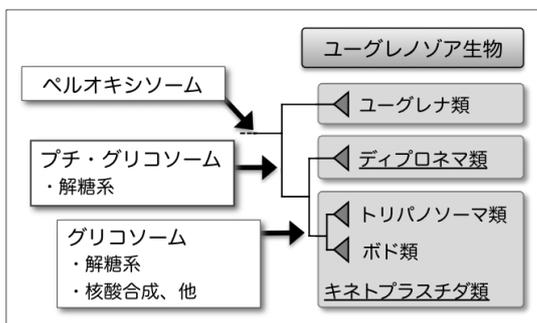


図1. ユーグレノゾア生物とペルオキシソームの進化。ユーグレナ類はペルオキシソームを持つ。ディプロネマ類とキネトプラスチダ類の共通祖先でグリコソームが成立し、キネトプラスチダ類でさらに他の代謝経路が移行したと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究はディプロネマのペルオキシソームに焦点を当て、代謝経路とオルガネラの共進化、すなわちオルガネラに新たな機能が付加され再構築される過程を再現し、代謝経路酵素の局在が変わることの生理的意義、およびオルガネラリモデリングの進化の原動力を徹底的に解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. *D. papillatum*

*D. papillatum* (ATCC® 50162) のゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサー(HiSeq2000、イルミナ社)を用いて全ゲノムを解読した(タカラバイオ(株)への委託)。

#### 3.2. 解糖系酵素の細胞内局在

*D. papillatum* の解糖系酵素について大腸菌を用いて組換え体タンパクを発現させ、ウサギまたはマウスに免疫し、各酵素に対する抗血清を得た。各酵素の細胞内局在を明らかにするために免疫蛍光染色を行なった。

#### 3.3. 標識化合物を用いたメタボローム解析

*D. papillatum* を6 mM  $^{13}\text{C}_6$  グルコースまたは  $^{13}\text{C}_5$  グルタミンでラベルした。低分子化合物を抽出し、CE-Q-TOFMS およびLC-MSを用いてグルコースおよびグルタミンの代謝中間体を定量した。

#### 3.4. 分子系統解析

*D. papillatum* の解糖系10酵素およびグリコソーム関連酵素のアミノ酸配列をクエリとして、既知の配列データベースよりホモログを取得し、PhyloBayes(C60 model)を用いて分子系統樹を作製した。

### 4. 研究成果

#### 4.1. *D. papillatum* 解糖系酵素群の同定

*D. papillatum* のゲノム配列に対する同源性検索によって、解糖系全10酵素遺伝子を同定することができた。一次構造比較の結果、第3酵素ホスホフルクトキナーゼ(PFK)および第6酵素グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を除く初段7酵素がPTSを持つことが明らかとなった(表1)。これらの結果は、解糖系酵素のペルオキシソーム移行がディプロネマ類とキネトプラスチダ類の共通祖先で起きたことを示している。興味深いことに、分子系統解析の結果 *D. papillatum* とキネトプラスチダ類で局在が同じであると予想される酵素であっても起原は必ずしも同一ではなく(表1)、両系統が分岐したのちに遺伝子の入れ替えが起きたことが明らかとなった。特に重要な進化的知見として、*D. papillatum* のPFKがディプロネマ類の分岐後に遺伝子水平転移を介して二次的に獲得されたことが示された。

表 1. *D. papillatum* 解糖系酵素の特徴

酵素 ( 数字は反応順序 )	PTS*	起源†
ヘキソキナーゼ ( 高親和性 )	2	Yes
グルコキナーゼ ( 低親和性 )	1	Yes
グルコースリン酸イソメラーゼ	1	Yes
ホスホフルクトキナーゼ	なし	No
フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ‡	1	No
アルドラーゼ	2	Yes
トリオースリン酸イソメラーゼ	1	不明
グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ	なし	No
ホスホグリセリン酸キナーゼ	1	Yes
ホスホグリセリン酸ムターゼ	なし	No
エノラーゼ	なし	Yes
ピルビン酸キナーゼ	なし	Yes

\*PTS には C 端部の 1 型と N 端部の 2 型が存在する。

†キネトプラスチダ類酵素と共通起源を持つか否か。

‡解糖の逆反応 ( 糖新生 ) を触媒する。

解糖系酵素は、アミノ酸を基質としてグルコース 6-リン酸を生じる「糖新生」にも必須である。重要な点として、PFK の反応は生理条件下で不可逆的であるため、その逆反応はフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBPase) ( 表 1、 ) が触媒する。*D. papillatum* FBPase はキネトプラスチダ酵素同様に PTS を持つことから、両系統の共通祖先において解糖系と糖新生の両経路がペルオキシソームに移行したことが示唆された。特に、*D. papillatum* の PFK は PTS を欠くため、*D. papillatum* では FBPase と協調した糖新生がペルオキシソームにおける糖代謝基盤となっている可能性が考えられた。

解糖系以外のグリコソーム局在性酵素について遺伝子を同定し、PTS の有無および分子系統解析を用いた起源推定を行なったところ、キネトプラスチダ類のグリコソームに特異的に局在する 18 酵素のうち、FBPase、グリセロールキナーゼ (GK) およびピルビン酸正リン酸ジキナーゼ (PPDK) にのみ PTS が付加されていた。GK と PPDK はどちらも ATP 生成に寄与する酵素であり、ペルオキシソーム内の ATP の恒常性を保つ役割を担うと考えられる。

さらに、キネトプラスチダ類のグリコソームに局在する酵素のうち、*D. papillatum* では PTS を持たない酵素について分子系統解析を実施し、酵素遺伝子の起源を推定した。その結果、キネトプラスチダ類のグリコソームに局在するアデニル酸キナーゼとイノシン-5-リン酸デヒドロゲナーゼ (プリン再利用経路) は遺伝子水平転移を介して新たに獲得したことが明らかとなった。ペントースリン酸回路の酵素であるトランスケトラーゼは、キネトプラスチダ類と *D. papillatum* で共通の起源を持つ一方で、キネトプラスチダ酵素にのみ PTS が付加されていた。これらの結果は、解糖系お

よび糖新生以外の代謝経路酵素はキネトプラスチダ類とディプロネマ類が分岐したのちにキネトプラスチダ類でペルオキシソームに移行したことを示している。

#### 4.2 . *D. papillatum* 解糖系酵素の細胞内局在

解糖系 11 酵素 ( グルコキナーゼを含む ) に対する抗体を作製し、ウエスタンブロットによって *D. papillatum* における酵素発現を確認したところ、初段酵素ヘキソキナーゼ (HK) および PFK のシグナルは検出されなかった。同様に、*D. papillatum* 抽出液中の酵素活性を調べると、HK および PFK 活性は検出限界以下であった。すなわち、*D. papillatum* は両酵素を発現していない可能性が強く示唆された。

特異抗体を用いた蛍光抗体染色 (HK、PFK を除く) を実施した結果、PTS を持つ酵素は全てペルオキシソームに局在することが判明した。

#### 4.3 . *D. papillatum* の糖代謝

*D. papillatum* が PFK 活性を持たないとすると、グルコースを基質とする解糖が行なわれていない可能性が考えられる。そこでグルコースを好適 C 源とする *Trypanosoma cruzi* ( シャーガス病の病原体 ) の上鞭毛期型と *D. papillatum* のグルコース消費を比較したところ、*T. cruzi* がグルコースを優先的に消費し、その後アミノ酸の消費を開始するのに対し、*D. papillatum* ではアミノ酸を優先的に消費し、グルコースは培養条件下ではほとんど消費されないことが明らかとなった。

#### 4.4 . *D. papillatum* のアミノ酸依存的・グルコース非依存的な糖代謝

アミノ酸およびグルコースの代謝動態についてさらに詳しく解析するために、<sup>13</sup>C<sub>5</sub> グルタミンまたは <sup>13</sup>C<sub>6</sub> グルコースの存在下で、飢餓処理を行なった *D. papillatum* をパルス標識し、<sup>13</sup>C が取り込まれた代謝中間体のメタボローム解析を行なった。<sup>13</sup>C<sub>5</sub> グルタミンは *D. papillatum* にただちに取り込まれ、ケトグルタル酸に転換して TCA 回路に入り、解糖の逆反応 ( 糖新生 ) を経てフルクトース 6-リン酸を生じることが明らかとなった ( 図 3A )。一方、<sup>13</sup>C<sub>6</sub> グルコースの標識はグルコース 6 リン酸へとわずかに取り込まれ、さらにペントースリン酸回路の中間体セドヘプツロース 7-リン酸へと取り込まれることが明らかとなった。すなわち、*D. papillatum* では PFK 活性の喪失と関連して解糖系を経由するグルコース代謝は起こらず、ペントースリン酸回路がその機能を補完していることが示唆された。

#### 4.5 . 総括

本研究によって、キネトプラスチダ類とディプロネマ類の共通祖先において、最初に解糖系、糖新生およびATP産生に寄与する酵素の一部がペルオキシソームに移行したこと(“始原グリコソーム”の成立)、解糖系および糖新生以外の代謝経路酵素はキネトプラスチダ類が分岐したのちに“始原グリコソーム”に移行したこと、*D. papillatum*では解糖に依存しない糖代謝が行なわれていること、が初めて明らかとなった。

*D. papillatum*はグルコース存在下で解糖を行わない真核生物として初めての発見である。*D. papillatum*がPFK活性を持たないこと、および同遺伝子を二次的に獲得したことを考えると、*D. papillatum*における糖新生依存的な糖代謝は、始原グリコソームの性質を残しているというよりも、補食を主体とする環境適応過程で獲得した二次的形質と捉えるべきかも知れない。

#### 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19件)

(英文)

1. Morales J, Hashimoto M, Williams TA, Hirawake-Mogi H, Makiuchi T, Tsubouchi A, Kaga N, Taka H, Fujimura T, Koike M, Mita T, Bringaud F, Concepción JL, Hashimoto T, Embley TM, Nara T. Differential remodelling of peroxisome function underpins the environmental and metabolic adaptability of diplomonads and kinetoplastids. *Proc R Soc B* 2016;283: 20160520 (査読有)
2. Hashimoto M, Nara T, Mita T, Mikoshiba K. Morpholino antisense oligo inhibits trans-splicing of pre-inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA of *Trypanosoma cruzi* and suppresses parasite growth and infectivity. *Parasitol Int* 2016;65: 175-179 (査読有)
3. Kobayashi I, Takahashi F, Nurwidya F, Nara T, Hashimoto M, Murakami A, Yagishita S, Tajima K, Hidayat M, Shimada N, Suina K, Yoshioka Y, Sasaki S, Moriyama M, Moriyama H, Takahashi K. Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib-resistant lung cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;473: 125-132 (査読有)
4. Nara T. Current situation of Chagas disease in non-endemic countries. *Juntendo Med J* 2015;61: 389-395 (査読有)
5. Hashimoto M, Nara T, Enomoto M, Kurebayashi N, Yoshida M, Sakurai T, Mita T, Mikoshiba K. A dominant negative form of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor induces metacyclogenesis and increases mitochondrial density in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;466: 475-480 (査読有)
6. Hashimoto M, Morales J, Uemura H, Mikoshiba K, Nara T. A novel method for inducing amastigote-to-trypomastigote transformation in vitro in *Trypanosoma cruzi* reveals the importance of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *PLoS One* 2015;10: e0135726 (査読有)
7. Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Kido Y, Tsuge C, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PA, Kita K, Harada S. Molecular basis for the reverse reaction of African human trypanosomes glycerol kinase. *Mol Microbiol* 2014;94: 1315-1329 (査読有)
8. Hashimoto M, Nara T, Hirawake H, Morales J, Enomoto M, Mikoshiba K. Antisense oligonucleotides targeting parasite inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits mammalian host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Sci Rep* 2014;4: 4231 (査読有)
9. Murakami A, Takahashi F, Nurwidya F, Kobayashi I, Minakata K, Hashimoto M, Nara T, Kato M, Tajima K, Shimada N, Iwakami S, Moriyama M, Moriyama H, Koizumi F, Takahashi K. Hypoxia increases gefitinib-resistant lung cancer stem cells through the activation of insulin-like growth factor 1 receptor. *PLoS One* 2014;9: e86459 (査読有)
10. Nurwidya F, Takahashi F, Kobayashi I, Murakami A, Kato M, Minakata K, Nara T, Hashimoto M, Yagishita S, Baskoro H, Hidayat M, Shimada N, Takahashi K. Treatment with insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor reverses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;455: 332-338 (査読有)

11. Nara T. Chagas Disease: Clear and Present Danger. *Juntendo Med J* 2014;60: 362-365 (査読有)
12. Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Kido Y, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PAM, Harada S, Kita K. Biochemical characterization of highly active *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase, a promising drug target. *J Biochem* 2013;154: 77-84 (査読有)
13. Hashimoto M, Enomoto M, Morales J, Kurebayashi N, Sakurai T, Hashimoto T, Nara T, Mikoshiba K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity and virulence of the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol* 2013;87: 1133-1150 (査読有)
14. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110: 4580-4585 (査読有)
15. Vicco MH, Ferini F, Rodeles L, Cardona P, Bontempi I, Lioi S, Beloscar J, Nara T, Marcipar I, Bottasso OA. Assessment of cross-reactive host-pathogen antibodies in patients with different stages of chronic chagas disease. *Rev Esp Cardiol* 2013;66: 791-796 (査読有)

(和文)

16. 奈良武司. トリコモナス症、ジアルジア症 . 性感染症の全て一病原体、診断、治療、予防 . 臨床と微生物 2016;43: 157-161
17. 奈良武司. シャーガス病 : 感染症最前線とグローバル・ヘルス . 医学のあゆみ 2016;253: 115-119
18. 奈良武司. 原虫・寄生虫検査に強くなるう : パベシア . 臨床と微生物 2013;40: 313-314
19. 奈良武司. 原虫・寄生虫検査に強くなるう : マラリア原虫 . 臨床と微生物 2013;40: 307-312

[学会発表](計6件)

1. 奈良武司, Jorge Morales, 橋本宗明、

Tom A. Williams, 平沢浩子, 牧内貴志, 坪内暁子, 加賀直子, 高ひかり, 藤村務, 美田敏宏, Frederic Bringaud, Juan L. Concepcion, 橋本哲男, T. Martin Embley . キネトプラスチダ類の特異オルガネラ、グリコソームは糖新生起原である . 第 84 回日本寄生虫学会大会、東京、2015

2. 橋本 宗明、ホルヘモラレス、御子柴克彦、奈良武司 . Novel method for inducing trypomastigogenesis *in vitro* in *Trypanosoma cruzi* reveals the importance of IP<sub>3</sub> receptor. 第 84 回日本寄生虫学会大会、東京、2015
3. 橋本宗明、戸井基道、呉林 - 国広なごみ、古川功治、茂木 - 平沢浩子、近江谷克裕、櫻井隆、美田敏宏、御子柴克彦、奈良武司 . Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor determines intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in *Trypanosoma cruzi* throughout its life cycle. 第 85 回日本寄生虫学会大会、宮崎、2016
4. 奈良武司、平沢浩子、角田宗一郎、細谷英里奈、三井颯太、美田敏宏 . クルーフトリパノソーマに「休眠現象」は存在するのか? 第 85 回日本寄生虫学会大会、宮崎、2016
5. Fan CK, Huang YH, Chou CM, Liao CW, Lee YL, Wang YC, Naito T, Tsubouchi A, Nara T. Seroprevalence, environmental and behavioral risk factors of *Toxocara canis* infection among women in Swaziland, Southern Africa. 第 85 回日本寄生虫学会大会、宮崎、2016

[図書](計5件)

1. 奈良武司. シャーガス病 (アメリカトリパノソーマ症). 人獣共通感染症改訂 3 版 . 木村哲、喜田宏編 . 大阪、医薬ジャーナル社、2015
2. 奈良武司. トリパノソーマ症 . 別冊骨格筋症候群第 2 版上巻、日本臨牀 . 大阪、日本臨牀社、2015
3. 橋本宗明、奈良武司. トリパノソーマ症 . 別冊感染症症候群第 2 版上巻、日本臨牀 . 大阪、日本臨牀社、2013
4. 奈良武司. ヌクレオチド代謝の項 . 岩波生物学辞典第 5 版、巖佐庸、倉谷滋、斎藤成也、塚谷裕一編、東京、岩波書店、2013
5. 奈良武司監訳 . Section 17 原虫および蠕虫感染症 : 概論、Part 8 感染症、ハリソン内科学第 4 版 (原著第 18 版) 上巻、福井次矢、黒川清監修、東京、メディカル・サイエンス・インターナシ

ヨナル、2013

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：トリパノソーマ関連疾患治療薬、トリパノソーマ原虫の感染阻止または殺虫方法、およびその利用

発明者：奈良武司、橋本宗明、御子柴克彦

権利者：独立行政法人理化学研究所および学校法人順天堂（共同出願）

種類：特許

番号：特願 2013-211448

出願年月日：2013年10月8日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奈良 武司 (NARA, Takeshi)

順天堂大学医学部・准教授

研究者番号：40276473

### (2) 研究分担者

モラレス ホルヘ (MORALES, Jorge)

順天堂大学医学部・助教

研究者番号：20596126