

論文の内容の要旨

論文題目 Study of fumarate reductases in *Trypanosoma cruzi*

和訳 クルーズトリパノソーマ原虫のフマル酸還元酵素についての研究

指導教官 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 高島 英造

## [緒言]

嫌気的環境下に生息する生物に広く観察されるフマル酸還元によるレドックス恒常性の維持は、これらの生物の生存に必須であり、フマル酸還元酵素(fumarate reductase; FRD)によって触媒されることが知られている。例えば解析の進んでいるカイチュウでは、幼虫期では哺乳類同様、好氣的呼吸鎖を利用しているが、成虫期にはヒト小腸内の嫌気的環境に適応してフマル酸を最終電子受容体として用いる嫌氣的呼吸を営むことが知られており、それに伴ってコハク酸を最終代謝産物として産生する。この系は肺吸虫など他の寄生虫ばかりでなく多くの嫌気性細菌にも観察される。

*Trypanosoma cruzi* は南米の風土病、シャーガス病を惹起する感染性原虫であるが、特効薬が無い事から治療薬の開発が急務となっており、サシガメ(大型のカメムシ類の昆虫)によって媒介され、図1のようなライフサイクルをとる。*T. cruzi* はTCAサイクルと呼吸鎖から構成される好氣的エネルギー代謝をすべてのステージで営んでいるが、一方、そのすべてのステージにわたってコハク酸を産生する事が知られている。このことから *T. cruzi* のフマル酸・コハク酸代謝系は、カイチュウなどの嫌氣的呼吸鎖とは大きく異なっている事が考えられ、未知のフマル酸還元系が *T. cruzi* のレドックス環境を維持していることが予測される。しかし、*T. cruzi* のコハク酸産生に深く関わっていると考えられるフマル酸還元酵素は精製されておらず、蛋白質レベルでの解析は進んでいない。本研究は、*T. cruzi* の各細胞画分についてFRD活性を確認し、FRDを分子レベルで同定することで、この原虫に特異的な代謝系を明らかにする事を目的としている。

### [FRD の細胞内局在]

最初に FRD の細胞内局在を調べる目的で *T. cruzi* を細胞分画し、ミトコンドリア、膜、細胞質画分を得た(表 1)。人工電子供与体である Methylviologen (MV)を用いて測定した FRD 活性 (MV-FRD)は細胞質画分とミトコンドリアに局在し、その約 40%が可溶画分に局在していた。ミトコンドリアに局在する MV-FRD は *T. cruzi* の複合体 II 由来であると考えられる。また、NADH の還元力によってフマル酸を還元する FRD 活性 (NADH-FRD) は同じくミトコンドリアに 93%局在していた。

### [細胞質 MV-FRD と DHOD]

共同研究を進めている Gao らは最近 *T. cruzi* のピリミジン *de novo* 合成系のすべての遺伝子をコードする遺伝子クラスターを同定した(*pyr* 遺伝子)。このうち核酸の塩基配列の相同性から、*pyr4* はフマル酸を電子受容体として用いるファミリー1A (表) のジヒドロオロト酸脱水素酵素(DHOD) に属する酵素をコードする遺伝子であることが予測された。そこで私は、可溶性 MV-FRD が *T. cruzi* DHOD によるものではないかと考え研究を進めた。

MV-FRD 活性を指標に、*T. cruzi* 細胞質画分に局在する DHOD をゲルろ過(TSK-gel 3000)を用いて部分精製した。MV-FRD のピークは二つに分かれ、そのうち低分子量 (~70kDa) のピークが DHOD 活性のピークと一致した (図 1)。このことから *T. cruzi* の可溶性 MV-FRD は少なくとも二種類の蛋白質からなり、そのうち低分子量のピーク (可溶性 MV-FRD の約 40%) は *T. cruzi* DHOD 由来であることが強く示唆された。この点を確認するために、*pyr4* 全長を用いた組換え DHOD(rDHOD)を大腸菌で pET system によって発現させ、Nickel-agarose chromatography を用いて精製した。得られた精製標品は、99%以上の純度を持っており、DHOD 活性と MV-FRD 活性の双方を有していた。また、抗組換え *T. cruzi* DHOD 抗体を用いた Immunoaffinity chromatography によって、*T. cruzi* 細胞質画分から CBB 染色でほぼ単一のバンド(~34kDa)にまで *T. cruzi* DHOD を精製した。精製標品は DHOD、FRD 活性、両酵素反応を触媒し、また、N 末端アミノ酸配列をエドマン分解法により決定した結果、*T. cruzi* DHOD 遺伝子から予測されるアミノ酸配列と一致したことから、少なくとも 2 種類ある可溶性 FRD のうちの 하나가、*T. cruzi* DHOD であることが明確になった。

ゲルろ過と SDS-PAGE による分子量のデータから、本酵素は溶液中でホモダイマーとして存在すると考えられた。さらに動的光散乱解析では、rDHOD が非常に均一な試料であることと、蛋白質分子が球形であることを仮定すると約 70kDa の分子量を持つことが示され、ゲルろ過の結果と一致した。また、分光学的解析では他の生物種由来の DHOD と同様、ジヒドロオロト酸(DHO)特異的なフラビンに還元による 350nm の吸光度の減少が観察された。

### [酵素学的性質]

本研究で *T. cruzi* の DHOD が MV からの還元力をフマル酸に伝達する MV-FRD 活性を持つということがはじめて見出されたので、さらにその酵素学的性質を調べた。Family 1A に属する DHOD はフマル酸の他、酸素を電子受容体として用いることができることが知られている。精製した *T. cruzi* DHOD は、フマル酸を電子供与体として用いた場合、酸素と比較して 12.6 倍の DHOD 活性を示した。これは同じ Family 1A に属する分裂酵母、*Enterococcus faecalis*、*Lactococcus lactis* の

DHOD と比較すると高い活性であり(それぞれ 4.3, 1.4, 3.0 倍)、*T. cruzi* DHOD が、生理的にも特にフマル酸還元に関わっていることを示唆している。

速度論的解析では、*r*DHOD の DHO およびフマル酸に対する  $K_m$  は原虫由来の DHOD とほぼ同一であった。そこで *r*DHOD を用いてさらに酵素学的解析を進めた。DHOD の Dead-end 阻害剤であるバルピツール酸は、DHO に対して拮抗的、フマル酸に対しては反拮抗的に *T. cruzi* DHOD を阻害した。この事は本酵素が Ping-pong Bi-Bi 機構で DHOD 活性を触媒している事を示している。またオロト酸は DHOD の生成物であり、他の Family 1A 酵素の DHOD 活性を精製物阻害する事が知られているが、*r*DHOD もオロト酸によって効果的に阻害された。このように *T. cruzi* DHOD はファミリー 1A に属する酵素であることが生化学的に確認された。さらに、MV 存在下の DHOD 活性の酵素学的解析から、MV の酸化還元部位の同定を試みた。その結果、MV は DHO と拮抗的に DHOD を阻害し、MV の結合部位は生理的な基質結合部位である DHO の結合部位と同一あるいは近傍に存在する事が示された。

#### [*T. cruzi* におけるフマル酸・コハク酸代謝]

以上の事実を基に *T. cruzi* のフマル酸に関わる代謝系を考察した (図 3)。TCA サイクル、二酸化炭素固定、アミノ酸分解によって得られるフマル酸は *T. cruzi* 細胞質内の *T. cruzi* DHOD、また、未知の可溶性 FRD によってコハク酸に還元され最終的に細胞外へ排出される。ミトコンドリアに局在する MV-FRD (表 1) は TCA サイクルのコハク酸-キノン酸化還元酵素(SQR)の逆反応であり、*T. cruzi* の複合体 II は FRD ではなく、SQR として働いていると考えられる。実際に SQR は *in vitro* において、逆反応を触媒する事が知られており、また *T. cruzi* にはユビキノンのみが存在し、複合体 II が FRD として機能するために必要な低酸化還元電位のメナキノンやロドキノンは存在しない。

NADH-FRD については、いまだ不明な点が多く、さらに解析が必要である。先行研究において、この NADH-FRD 活性は高濃度の KCl によって可溶化される事が明らかになっている。カイチュウ成虫のミトコンドリアにも NADH-FRD が存在するが、これはカイチュウの嫌氣的呼吸鎖の膜酵素である複合体 I と複合体 II によるものであって、KCl によって可溶化されないことから、*T. cruzi* の NADH-FRD は未知の FRD である事が示唆される。*T. cruzi* NADH-FRD の分子レベルでの解析を行うことによって、より詳細かつ正確な *T. cruzi* の代謝系の全体像を得ることができると考えられる。

本研究では、可溶性 MV-FRD 活性が少なくとも二種類の蛋白質によって担われ、そのうちの一部が *T. cruzi* の増殖に必須な核酸合成系のピリミジン代謝酵素のひとつ、DHOD であることを明らかにした。*T. cruzi* DHOD はファミリー 1A に属する酵素であり、ヒトに存在するファミリー 2 の DHOD とはその細胞内局在性、基質特異性が異なり、構造も大きく異なっていることが予想される。また大腸菌内で機能的に発現させた *r*DHOD は原虫由来の *T. cruzi* DHOD と生化学的に同等の機能を持っていることから、この *r*DHOD を用いてさらに *T. cruzi* DHOD の分子レベルでの解析を進めることによって、新規抗トリパノソーマ薬の開発に大きく寄与できると期待される。

図1 *T. cruzi*の生活環

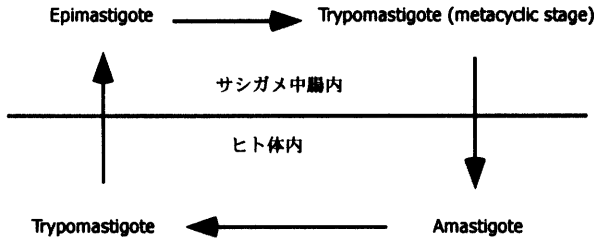
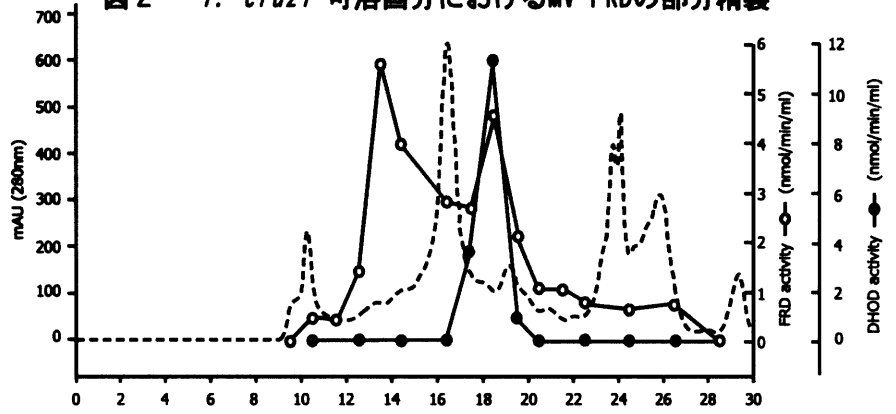


図2 *T. cruzi* 可溶画分におけるMV-FRDの部分精製



10 mg の *T. cruzi* 原虫の可溶画分をTSK-Gel3000を用いてゲルろ過を行った。白丸、黒丸はそれぞれFRD活性、DHOD活性を表わしている。点線はO.D. 280nmを表わしている (arbitrary unit, AU)。流速= 1 ml/min, 分画容量 = 1 ml。

表1 *T. cruzi*の各細胞画分におけるフマル酸・コハク酸代謝に関する酵素の比活性

	Methylviologen-FRD	NADH-FRD	SDH*	DHOD**
	(nmol/min/mg)			
Mitochondria	20 ± 6.6	5.6 ± 1.1	72 ± 5.1	N.D.
Membrane	9.7 ± 5.3	3.5 ± 1.0	11.7 ± 6.2	N.D.
Cytosol	3.6 ± 0.9	N.D.	N.D.	1.6 ± 0.4

すべての測定は25°Cで行った。結果は独立した三つの実験の平均±標準偏差を表した。

\*コハク酸脱水素酵素活性

\*\*DHOD 活性の測定は1 mMフマル酸存在下で行った。

N.D. = 非検出

表2 DHODの分類

ファミリー	細胞内局在性	四次構造	補欠分子族	電子受容体	分布
1A	細胞質	ホモダイマー	2FMN	フマル酸、O <sub>2</sub>	分裂酵母など少数
1B	細胞質	ヘテロテトラマー	2FMN+2FAD	NAD	グラム陽性菌
2	ミトコンドリア または膜結合性	モノマー またはダイマー	FMN	キノン	グラム陰性菌、 哺乳類など広範

図3 *T. cruzi*のフマル酸・コハク酸代謝モデル

