

論文の内容の要旨

化学療法標的分子としてのカイチュウミトコンドリア複合体IIの生化学的解析

氏名 長内 理大

(序)

寄生性線虫カイチュウの成虫は、哺乳類の小腸内という、酸素分圧が大気中の1/4(5%)の環境に適応するためにNADH-フマル酸還元系と呼ばれる、酸素を必要としない独特の嫌氣的呼吸鎖を進化させている(図1)。この特殊なエネルギー産生系は、哺乳類のいわゆる酸化的リン酸化との相違から、抗寄生虫薬の標的となり得ることが考えられる。実際、私の所属する研究グループは、カイチュウのこの系の構成成分の1つである複合体Iを選択的に阻害するナフレジンが、寄生線虫の卵の産生を抑えるという事実を見いだしている(Omura *et al.* 2001)。一方、NADH-フマル酸還元系のもう1つの構成成分である複合体IIも、コハク酸-コビキノ(UQ)酸化還元酵素(SQR)として機能する哺乳類複合体IIとは逆反応のフマル酸還元を触媒する事から(図2)、複合体Iと同様、抗寄生虫薬の標的になると考えられてきたが、それを直接示す生化学的研究はこれまでなされていなかった。これは、カイチュウが呼吸鎖の中で用いているロドキノ(RQ)の短鎖イソプレン誘導体が合成されておらず、またキノールが容易に自酸化するためロドキノール-フマル酸還元活性の測定ができなかったこと、ミトコンドリアには、内在性の基質や他の酸化還元酵素が多数存在して正確な酵素活性の測定が困難であり、逆にミトコンドリア内膜から可溶化した複合体IIは非常に酵素活性を失いやすいことなどに起因している。

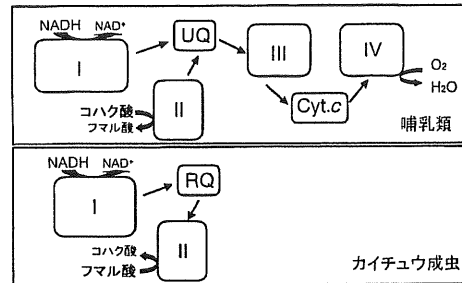


図1 哺乳類ならびにカイチュウの電子伝達系

本研究では、これらの問題を解決し複合体IIを標的にする抗寄生虫薬を開発する目的で、高純度かつ高活性の酵素を大量に精製した。さらに、この標品を用いて詳細な酵素学的な解析を行い、カイチュウ成虫複合体IIは、ウシ心筋複合体IIと比べフマル酸に対する親和性が高いこと、真菌の複合体IIの阻害剤であるフルトラニルがカイチュウ複合体IIを特異的に阻害することを見いだした。さらに、酵素の触媒機構や、阻害剤の阻害機構を直接的に解析する目的で結晶化を試み、微結晶を再現性よく得た。

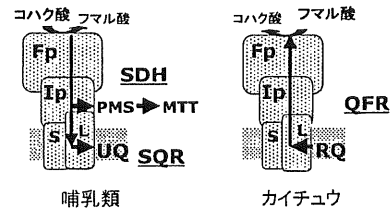


図2 ミトコンドリア複合体II

本研究では、これらの問題を解決し複合体IIを標的にする

抗寄生虫薬を開発する目的で、高純度かつ高活性の酵素を大量に精製した。さらに、この標品を用いて詳細な酵素学的な解析を行い、カイチュウ成虫複合体IIは、ウシ心筋複合体IIと比べフマル酸に対する親和性が高いこと、真菌の複合体IIの阻害剤であるフルトラニルがカイチュウ複合体IIを特異的に阻害することを見いだした。さらに、酵素の触媒機構や、阻害剤の阻害機構を直接的に解析する目的で結晶化を試み、微結晶を再現性よく得た。

(方法と結果)

1. カイチュウ成虫ミトコンドリアの調製

これまで、カイチュウのミトコンドリア調製では、MSE液(0.21 M マンニトール、0.07 M スクロース、0.1 mM EDTA)を用いた方法が報告されているが、カイチュウの筋肉ではこの方法では懸濁液の粘性が高くなり、大量に筋肉を処理するのに適さないことから、種々の条件を検討した。その結果、骨格筋のミトコンドリア調製で報告されているChappell-Perry液(0.1 M 塩化カリウム、50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)、1 mM ATP、5 mM 硫酸マグネシウム、1 mM EDTA)を用いた方法で1 kgのカイチュウ成虫筋肉より、タンパク質にして1000 mgのミトコンドリアを調製することが可能となった。

2. カイチユウミトコンドリア複合体Ⅱの精製

カイチユウ成虫複合体Ⅱの精製については、すでに高宮らによる報告がある (Takamiya *et al.* 1986)。しかし、この方法は回収率が低く、しかも複合体Ⅲの混入も認められ本研究の目的に用いる事はできない。そこで、界面活性剤による可溶化の条件、各種カラムクロマトグ

ラフィーによる精製法を検討した結果、以下の方法を確認した。すなわち、ミトコンドリア(タンパク質 1000 mg)を 2.5 % (w/v) スクロースモノラウレートで可溶化し、超遠心後の上清を DEAE セファロースカラム、SOURCE15Q カラムで精製した(表 1、図 3)。本法は高い再現性を示し、また得られた標品は、cDNA の塩基配列から予想される分子量 70,000、30,000、15,000、13,000 の 4 つのサブユニットのバンドのみを含む、極めて高純度の複合体Ⅱであった。最終標品の酸化還元差スペクトルから算出したヘム *b* および FAD は、複合体 1.0 μmole あたり、それぞれ、1.0 μmole 、1.1 μmole となり、精製したカイチユウ複合体Ⅱ 1 分子には、ヘム *b* ならびに FAD がそれぞれ 1 分子結合していると推測された。

	Protein (mg)	Total Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Specific Activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Yield (%)	Fold
Mitochondria	1000	300	0.3	100	1
SML extract	400	300	0.75	100	2.5
DEAE-sepharose	90	225	2.5	75	8.3
SOURCE15Q 1 st	25	80	3.2	26	10.6
SOURCE15Q 2 nd	7.5	33.8	4.5	12	15.0

表1 カイチユウ複合体Ⅱの精製

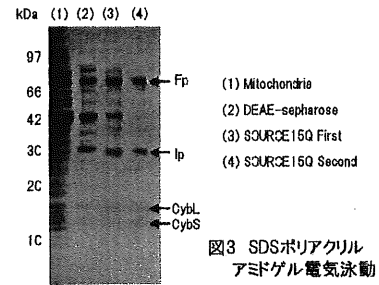


図3 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

3. カイチユウ複合体Ⅱの酵素学的解析

カイチユウ複合体Ⅱが、哺乳類由来の複合体Ⅱと性質がどのように異なるかを知る目的で、酵素学的解析を行った。ロドキノール-フマル酸還元酵素(QFR)活性については、京都大学の三芳によって合成された短鎖イソプレノ側鎖のロドキノン誘導体を用い、嫌気的条件下で行った。ミカエリス定数(K_m)を指標として基質に対する親和性の相違を調べた結果、カイチユウ複合体Ⅱは、ウシ心筋複合体Ⅱと比べてフマル酸に対し高い親和性を持っていることがわかった(表 2)。

複合体Ⅱ	K_m (μM)	
	SQR (コハク酸)	QFR (フマル酸)
カイチユウ	700	6.8
ウシ心筋	910	110

表2 基質に対する K_m 値

4. 阻害剤の複合体Ⅱに対する作用

次に、複合体Ⅱの活性を阻害することが報告されている阻害剤について、カイチユウ複合体Ⅱに対する作用を調べた。その結果、ウシ心筋複合体Ⅱの活性を阻害すると報告されている TTFA (テノイルトリフルオロアセトン)は、カイチユウ複合体Ⅱを阻害しなかった。また、複合体Ⅱが作用点であると報告されている抗線虫薬、チアベンダゾール、レバミゾールは、本酵素に対して阻害活性を示さず、これは、以前の報告が、比活性、純度ともに低いミトコンドリアを標品として用い、酵素活性の測定法も非特異的であったことに起因すると考えられる。一方、真菌の複合体Ⅱを阻害すると報告されているフルトラニルは、0.1 mM でカイチユウ複合体Ⅱの活性を 70 % 阻害した(表 3)。

複合体Ⅱに対する阻害剤	Inhibition (%)	
	SQR	QFR
哺乳類		
Malonate (1 mM)	100	100
TTFA (1 mM)	10	0
カイチユウ		
Thiabendazole (0.5 mM)	0	0
Levamisole (1 mM)	0	0
細菌・真菌		
Oxantel (0.5 mM)	0	0
Flutolanil (0.1 mM)	70	70

表3 カイチユウ複合体Ⅱに対する阻害剤の作用

5. フルトラニルの複合体Ⅱに対する作用

上記の結果から、フルトラニルについて、ウシ心筋複合体Ⅱを用い、その相違について、さらに詳細に検討した。その結果、フルトラニルは、カイチュウ複合体Ⅱについては、SQR 活性、QFR 活性ともに、 IC_{50} が約 $1 \mu\text{M}$ で阻害するが、ウシ心筋複合体Ⅱは、両反応とも IC_{50} が $40\text{--}50 \mu\text{M}$ と高く、カイチュウ複合体Ⅱをより選択的に阻害することがわかった。また、フルトラニルは、カイチュウ複合体Ⅱ、ウシ心筋複合体Ⅱともに触媒部分のみの活性を測定する SDH (コハク酸脱水素酵素活性、図 2) を阻害しないことから、その作用点は、キノンへの電子伝達に関わる膜アンカー部分であると考えられた(表 4)。

複合体Ⅱ	IC_{50} (μM)		
	SDH	SQR	QFR
カイチュウ	>100	0.9	1.3
ウシ心筋	>100	50	38

表4 フルトラニルに対する感受性

6. カイチュウミトコンドリア複合体Ⅱの結晶化

薬剤開発の戦略のひとつとして、複合体Ⅱを結晶化し立体構造の情報を得て、これに基づいた薬剤開発を行うことを考え、本酵素の結晶化を試みた。結晶化には、酵素を安定に保つ必要があるが、カイチュウ複合体Ⅱは、24 時間室温に放置すると、活性が 50 % 低下する。種々の条件を検討した結果、マロン酸を 1 mM 添加することにより、酵素活性を 2 週間、 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ で安定に保つことができた。そこで、マロン酸を添加物として加え、2000 通りの結晶化条件を試みた。その結果 20 % ポリエチレングリコール 3350 を沈殿剤とし、 0.2 M 塩化ナトリウム、 0.3% C12E8、 0.2% ドデシルマルトシドを含む条件で、約 $30 \mu\text{m}$ の微結晶が再現性よく得られるようになった(図 4)。

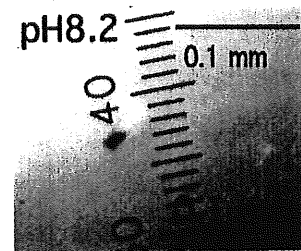


図4 カイチュウ複合体Ⅱの微結晶

(考察とまとめ)

カイチュウミトコンドリア複合体Ⅱは、哺乳類の SQR と比べ、逆反応を触媒する QFR として機能し、ロドキノンを基質にするなどの特徴的な性質を持っており、以前より抗寄生虫薬の標的分子として注目されていたが、生化学的、酵素学的実験が困難なことから、それを裏付ける研究は遅れていた。今回、カイチュウ筋肉から、ミトコンドリアを大量に効率よく調製し、このミトコンドリアから高純度の複合体Ⅱを精製する方法を確立した。精製された複合体Ⅱは、高い活性を保持しており、これによって、詳細な酵素学的解析、結晶化の実験が可能となった。その結果、カイチュウ複合体Ⅱがウシ心筋複合体Ⅱと比べ、フマル酸に対し親和性が高い事、阻害剤に対する感受性が異なる事を見出した。特に、フルトラニルは、複合体Ⅱを阻害することによって真菌の増殖を抑えるとされている化合物で、本研究でカイチュウ複合体Ⅱを特異的に阻害したことは、この化合物が抗寄生虫薬のリード化合物として有望であることを強く支持する結果である。さらに、カイチュウ複合体Ⅱの結晶化を試み、再現性よく微結晶を得る条件を見出した。複合体Ⅱの立体構造は、これまで細菌類で 2 種類報告されているが、ミトコンドリア複合体Ⅱの立体構造に関する情報は著しく不足しており、この結晶をもとに立体構造の解明が進めば、カイチュウのみならず、ミトコンドリア複合体Ⅱの触媒メカニズムを解明する一助になると期待される。

(文献)

Omura S. *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 60-62

Takamiya S. *et al.* (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **848**, 99-107