

〔論文の内容の要旨〕

Gene disruption of the flavoprotein subunit in succinate-ubiquinone reductase from *Plasmodium falciparum*

遺伝子破壊法による熱帯熱マラリア原虫コハク酸-ユビキノン還元酵素 Fp サブユニットの解析

国際保健学専攻

平成 17 年度進学

田中 健

< 緒言 >

マラリアは *Anopheles* 属の蚊によって媒介される *Plasmodium* 属の原虫が引き起こす寄生虫感染症である。ヒトに感染するマラリア原虫は *Plasmodium falciparum*、*P. vivax*、*P. malariae*、*P. ovale* の 4 種類であり、この中、*P. falciparum* が最も重篤な症状を引き起こす。主にアフリカ、アジア、ラテンアメリカの熱帯地域において、毎年 2 億 7000 万人の感染者と 100 万人の死者を出している。治療薬としてクロロキン、スルファドキシシン・ピリメサミン合剤などが用いられているが、近年になって薬剤耐性原虫が出現し、新規抗マラリア薬、マラリアワクチンの開発が急務となっている。新規抗マラリア薬、マラリアワクチンの開発には原虫の代謝系、性分化機構、宿主-寄生虫間相互作用機構などの幅広い情報が不可欠であるが、現在のところ十分であるとは言いがたい。そのため、マラリア原虫に関する詳細な基礎研究が必要である。

マラリア原虫の生活環については、まず、マラリア原虫を保持した蚊が吸血した際にスポロゾイト期の原虫がヒト体内に入り、血流によって肝臓に達し肝細胞に侵入する。肝細胞内で増殖した原虫はメロゾイトとなり血流中に放出され、赤血球に侵入する。原虫は赤血球内で発育し、多数のメロゾイトに分裂する。メロゾイトは赤血球を破壊し新しい赤血球に侵入し、発育して同様のサイクルを繰り返す。この時期の原虫は赤内型原虫と呼ばれ、

ヒトにマラリアの症状を引き起こす。赤内型原虫は主に解糖系によって ATP を合成している。*P. falciparum* のゲノム解析により、エネルギー代謝に関わるタンパク質の一部や β 酸化に関わるタンパク質のホモログが存在しないことが示されたことや、赤内型原虫ミトコンドリアにクリステが存在しないことなどから、エネルギー転換系におけるミトコンドリアの役割は不明であった。一方、赤内型原虫において TCA 回路は機能していないと考えられていたが、TCA 回路を構成する酵素は全てゲノム上に存在していた。私の所属する研究グループは、TCA 回路構成酵素の一つであるコハク酸ユビキノン還元酵素 (SQR) で、同時に呼吸鎖の構成酵素でもあるミトコンドリア複合体 II に注目して解析を進めており、2000 年には触媒部位の遺伝子をクローニングした。また、*P. falciparum* はコハク酸により酸素消費を示し、原虫ミトコンドリアが SQR 活性とコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性を示すことを発見した。これらの結果は、赤内型原虫において複合体 II が機能していることを示している。そこで、本研究において私は、*P. falciparum* の赤内型原虫内の生存におけるミトコンドリア複合体 II の役割を明らかにすることを目的として、複合体 II の機能低下による原虫への影響を観察した。

<方法と結果>

複合体 II は通常、触媒部位を構成するフラボプロテイン (Fp) サブユニットと鉄硫黄クラスター (Ip) サブユニット、及び、アンカー部位であるシトクロム *b* 大サブユニット、シトクロム *b* 小サブユニットの合計 4 個のサブユニットで構成されている。複合体 II の機能を低下させるため、触媒部位のフラボプロテイン (Fp) サブユニットをコードする *pfsdha* 遺伝子の破壊を行った。アンチセンス RNA/DNA や RNA 干渉法は *P. falciparum* において確立されておらず、また、私は複合体 II が生存に必須であると考えていたことから、ノックアウトではなく、アンハイドロテトラサイクリン (ATc) 依存性遺伝子発現調節システムを用いてコンディショナルノックアウト株の樹立を試みた。しかしながら、得られた *pfsdha* 遺伝子破壊株は ATc による遺伝子発現調節機能を失っており、恒常的に *pfsdha* の発現が低下していた。その発現抑制の程度をノザンブロットによって解析したところ、遺伝子破壊株では検出限界以下にまで抑制されていることが明らかとなった。さらに、ウェスタンブロットによる解析により、Fp サブユニットだけでなく Ip サブユニットもタンパク質レベルで発現が低下していることが明らかとなった。そして、遺伝子破壊株ミトコンドリアが SQR 活性と SDH 活性を示さなかったことから、*pfsdha* 遺伝子破壊により複合体 II の機能が大きく低下していることが示された。複合体 II は呼吸鎖の一部であるため、機能低下がミトコンドリア膜電位に影響する可能性が考えられたが、MitoTracker を用いた方法では変化は観察されなかった。次に、増殖への影響を解析したところ、遺伝子破壊株で増殖が阻害されることが観察された。また、この増殖阻害は SQR の基質であるコハク酸によって回復したが、QFR の基質であるフマル酸は効果を示さなかった。

<考察>

複合体Ⅱの機能低下を目的として、私は ATc 依存性 *pfsdha* コンディショナルノックアウト株の樹立を試みた。しかし、遺伝子破壊株では ATc による遺伝子発現調節能が失われており、恒常的な *pfsdha* 発現抑制株が得られた。この ATc による遺伝子発現調節能の消失は、コントロールの形質転換株でも確認された。また、このシステムを作成した Brendan S. Crabb 博士によれば「長期間の培養によって、トランスアクチベーターの発現量の低下または ATc 反応性の低下によるものと考えられる ATc 依存性遺伝子発現調節能の低下が起こること」が記されている。詳しい機序は不明ながら、本研究においても長期間の培養が遺伝子発現調節能の消失を引き起こしたと考えられる。

得られた *pfsdha* 遺伝子破壊株は ATc による遺伝子発現調節能を失っていたものの、恒常的な *pfsdha* 発現抑制と複合体Ⅱの機能低下が起こっており、本研究の目的には合致していた。そこで、解析を行ったところ、複合体Ⅱの機能低下はミトコンドリア膜電位には影響しないものの、増殖を阻害することが明らかとなった。これは、複合体Ⅱが赤内型原虫の生存に寄与していることを示している。そして、この増殖阻害がコハク酸では回復されるが、フマル酸は効果を示さないことが明らかとなった。この結果は、赤内型原虫において複合体Ⅱが SQR の逆の反応を行うキノール-フマル酸還元酵素 (QFR) として機能しており、それによって産生されたコハク酸が原虫の生存に寄与していることを示唆している。

以上をまとめて、本研究により

1. 複合体Ⅱは赤内型原虫の生存に寄与していること
 2. 複合体Ⅱは SQR ではなく QFR として機能していること
 3. 複合体Ⅱによって産生されたコハク酸が原虫の生存に寄与していること
- が示された。コハク酸はスクシニル CoA 合成酵素によりスクシニル CoA に変換されることで、赤内型原虫の生存に必須であるヘムの生合成に用いることが可能である。多くの生物においてスクシニル CoA の主な供給源である TCA 回路や β 酸化が *P. falciparum* の赤内型原虫には存在していないことから、「複合体Ⅱによって産生されたコハク酸がスクシニル CoA 合成酵素によりスクシニル CoA に変換され、ヘム生合成系に用いられている」と考えることができる。本研究から、ヒトにマラリアの症状を引き起こすステージである赤内型 *P. falciparum* ミトコンドリアにおける複合体Ⅱの機能が明らかになった。さらに、今回得られた *pfsdha* 遺伝子破壊株は、生活環における他のステージの複合体Ⅱやミトコンドリアの役割の解明に大いに貢献すると考えられる。