

解説

寄生適応の分子機構：低酸素適応とエネルギー代謝

北 潔

東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻生物医化学教室

(平成 11 年 8 月 20 日受理)

Molecular Mechanisms of Parasitism: Adaptation to Hypoxia and Its Energy Metabolism

Kiyoshi KITA

Department of Biomedical Chemistry, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Key words: mitochondria, anaerobic energy metabolism, parasite, succinate dehydrogenase, fumarate reductase.

はじめに

生物は独立した生命を持ち独自の生活を営んでいるが、一方他の生物と深いかわりを保ちながら生存している。寄生現象もこの様な関係のひとつと考えられ、自由生活の祖先から出発し、寄生生活への移行にともなう進化の過程において宿主内の環境に適応して宿主特異性や臓器特異性を備えた種々の寄生虫が成立したと考えられる。本稿では生物の生存に必須な基本要素の一つであるエネルギー代謝に焦点を絞り、寄生虫が酸素分圧の低い宿主内の環境にどの様に適応しているかという点について、筆者らの研究を中心に最近の知見を述べる。

寄生虫は大きく分けて蠕虫と原虫の2種に大別される。前者は多細胞の寄生性動物であり線虫(回虫など)、吸虫(日本住血吸虫など)およびサナダムシと呼ばれる条虫(広節裂頭条虫など)の3種がある。一方、後者はマラリア原虫や赤痢アメーバなど単細胞の寄生虫であるが、細菌とは異なり、核を持ち食胞やミトコンドリア、またヒドロゲノソームなどのオルガネラを含んでいる。これら寄生虫は巧みな生物戦略によって宿主の持つ生体防御機構から逃れ、またその特殊な宿主内の環境に適応するための代謝経路を発達させて増殖する。この様な寄生適応についての研究は感染症の克服と言う重要な課題に加え、極めて興味深い生物学的発見をもたらして来た。特に近年の生化学的、分子生物

学的な解析法の進展に伴い、これまでの基礎生物学の分野に新しい概念を与え、生物の進化や多様性の領域に関して多くの革新的な成果が生まれている。例えばトリパノソーマにおける RNA 編集 (RNA editing) や GPI アンカー発見の糸口となった表面抗原タンパク質 VSG (variable surface glycoprotein)、また線虫やトリパノソーマの mRNA の 5' 末端におけるトランススプライシングなどである。このような現状を背景として分子レベルで寄生現象を理解しようとする「分子寄生虫学」と呼ばれる新しい分野が確立しつつある。以上の様な新しい動きの中で、本稿でとりあげるエネルギー代謝の研究と寄生虫学は歴史的に見ても非常に密接な関係にある。我々哺乳類が酸素を利用して ATP を合成する酸化的リン酸化において呼吸は重要な構成成分のひとつであるが、この呼吸において主役を演じているシトクロムが実は寄生虫の研究によって発見された事を知る読者はけっして多くはないだろう。今から約 80 年前、寄生虫学者のケイリン (Keilin) はウマに寄生するウマバエの幼虫を顕微分光器を使って観察していたところ、酸素が不足する嫌気的な条件において、ある特有な波長の吸収帯が出現し、これに酸素を通じる事によって吸収が消失する現象を見出した。これが酸化還元によるシトクロムのスペクトル変化であり、その吸収帯の波長によってシトクロム c, b あるいは a と名付けられたのである。ケイリンによるシトクロムの発見は長く続いたワールブルグとウィーランドの論争に結論を与え、その後の酸化的リン酸化における化学浸透

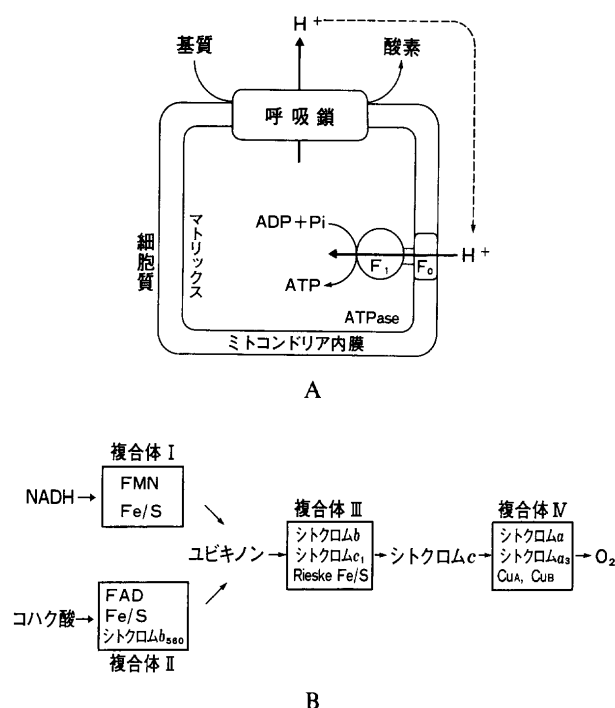


図1 A: 酸化的リン酸化の概念図。

B: 哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系。

圧説を導く概念の基礎となったのである¹⁾。

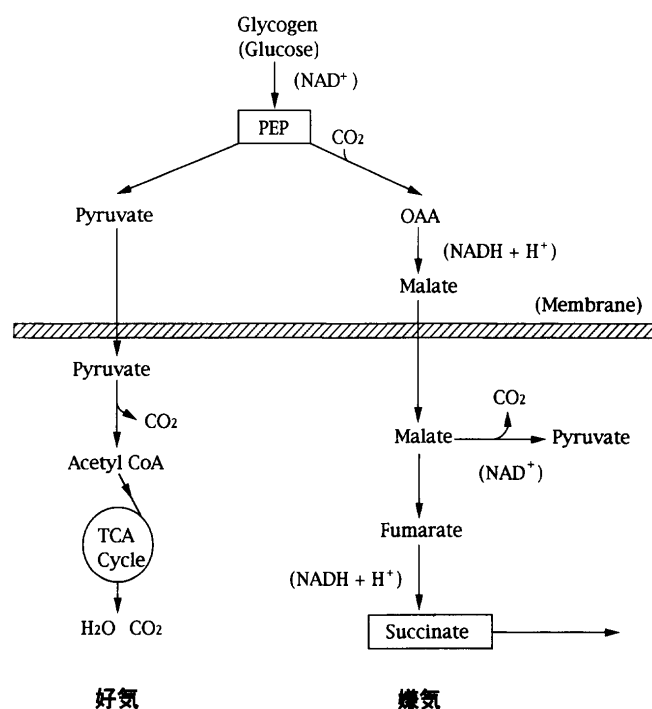
図1にわれわれ哺乳類をはじめとする好気性生物における酸化的リン酸化について示した。エネルギーを必要とする生体反応に中心的な役割を果すATPの合成は酸素がない場合はいわゆる解糖系によって行われるが、そのエネルギー転換効率は低い。しかし酸素の供給の充分な好気的環境ではグルコースから生じたピルビン酸はアセチルCoAとなりクエン酸回路 (TCA 回路) によって水と二酸化炭素にまで分解される。ここで生成されたNADHやコハク酸は呼吸鎖電子伝達系の基質となり、最終的に酸素によって酸化される。呼吸鎖は細菌では細胞膜、真核生物ではミトコンドリアに局在するが、この呼吸にともない複合体I, IIIおよびIVに存在するH⁺(プロトン)-ポンプが駆動し水素イオンが外部へ汲み出され、[H⁺]の濃度差 (ΔpH) と膜電位差 (Δψ) から成る電気化学ポテンシャルが形成される。この電気化学ポテンシャルを駆動力としてATP合成酵素によりADPとリン酸からATPが合成される。酸化的リン酸化は細菌からヒトまで好気性生物のエネルギー代謝において普遍的な生物反応であるが、低酸素分圧の環境に生息する寄生虫はこの宿主の代謝系とは大きく異なった経路によってエネルギー転換反応を行っているのである。1925年の著作「On Cytochrome, a Respiratory Pigment Common to Animal, Yeast and Higher Plants」の中でケイリンは寄生虫の代名詞ともなっている回虫の呼吸鎖についても触れているが、最近になってその多様性の詳細が分子のレベルで明らかになって来た²⁾。

蠕虫のエネルギー代謝

蠕虫類のエネルギー代謝については特に回虫や糸状虫などの線虫類、また住血吸虫や肺吸虫などの吸虫類に関して研究が進められ、これらの成果の詳細は多くの総説にまとめられている^{3,4)}。ここでは特に精力的に研究が進められて来た回虫のエネルギー代謝について筆者らの結果を中心に研究の現状を紹介する。

1. 回虫の生活環と呼吸鎖の変動

回虫は最もよく知られた寄生虫であり、古くからヒトや家畜の寄生虫の代表として研究の対象となってきた。回虫は研究材料としての入手が比較的容易であり、また虫体のサイズが大きいことから生化学的解析に最適な系として研究が進められて来た。回虫成虫は我々哺乳類の小腸に生息し、雌は1日に20~40万個の受精卵を産出する。虫卵は糞便とともに排出され通常の温度環境では約2~3週間で感染可能な第2期幼虫 (L2) を含む成熟卵となる。これが宿主に経口的に摂取されると小腸に達し、ここで初めて孵化する。孵化した幼虫は腸壁内に侵入し、肝臓、肺、気管、咽頭から再び食道、胃を経て最終的に小腸へ到達し成虫となる。小腸はpO₂が2.5~5%であり外界に比べ約1/4と低酸素分圧の環境になっており、成虫のエネルギー代謝は幼虫や宿主と大きく異なっている。すなわち成虫においては糖の嫌氣的分解経路であるPEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)-コハク酸経路 (図2) が作動しており、低酸素条件下でもATPの産生が可能になっている。この系は回

図2 PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase)-コハク酸経路³⁾

PEP: ホスホエノールピルビン酸, OAA: オキサロ酢酸。

虫ばかりでなく多くの寄生虫に見られるが、嫌気条件下でのエネルギー転換反応を必要とするカキの閉殻筋や潮干帯の二枚貝などにも報告されており、エネルギー代謝系における環境適応という点で一般性の高い経路と考えられる³⁾。PEPCK-コハク酸経路の前半は哺乳類同様に解糖系に沿って進行し、ホスホエノールピルビン酸(PEP)が生成する。哺乳類などにおける好氣的代謝ではPEPはピルビン酸キナーゼによってピルビン酸となり、アセチル CoA を経て TCA 回路により CO₂ と水に分解される。これに対して回虫成虫では PEPCK により CO₂ を固定し、オキサロ酢酸(OAA)を生成する。OAA はリンゴ酸脱水素酵素の逆反応によりリンゴ酸となってミトコンドリア内へと輸送され、ピルビン酸とフマル酸を生じる。そしてリンゴ酸からピルビン酸を生成する際に形成された NADH の還元当量を用いてフマル酸はコハク酸へと還元される。この経路の最終ステップであるコハク酸の生成には回虫成虫ミトコンドリアに特有な嫌氣的電子伝達系である NADH-フマル酸還元系が関与しているが、その詳細については後述する。この成虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系には末端酸化酵素であるシトクロム *c* 酸化酵素(複合体 IV)は検出されず、ユビキノール-シトクロム *c* 還元酵素(複合体 III)の含量も極めて低い。一方、その発生に酸素を必要とする回虫の幼

虫ではエネルギー代謝は好氣的であり、実際に受精卵を通気培養して得た L2 幼虫からミトコンドリアを分離して生化学的に調べてみると呼吸鎖電子伝達系の構成は図 1 に示した哺乳類とはほぼ同様である(図 3)。また脱水素酵素複合体と電子の授受を行う低分子の電子伝達体であるキノン類も大きく変化する。好氣的代謝を行っている幼虫では哺乳類同様にユビキノンが機能しているが、成虫では酸化還元電位の低いロドキノンが主成分となり NADH-フマル酸還元系の構成成分として重要な役割を果たしている(図 4)。この様に回虫はその生活環において環境の酸素分圧の変化に対応し、呼吸鎖を大きく変動させて適応している。最近の研究によってこの回虫、特に成虫のミトコンドリア電子伝達系の特徴がタンパク質分子のレベルで明らかになってきた。

2. NADH-フマル酸還元系と複合体 II

回虫成虫の嫌氣的エネルギー代謝に中心的な役割を果たしている PEPCK-コハク酸経路の最終ステップは前項で述べた様に NADH-フマル酸還元系によって触媒されている。この系においては NADH からの還元力は NADH-ユビキノン還元酵素複合体(複合体 I)によって低電位のロドキノンに伝達され、最終的に複合体 II によってフマル酸を還元しコハク酸を生成する。この系の特徴はエネルギー効率は低いが、酸素を利用せずに複合体 I の共役部位を駆動し ATP を合成する事ができる点である。同様の嫌氣的呼吸系は回虫以外にも多くの寄生虫ミトコンドリアに存在し、さらに細菌類にも見出されている。細菌では大腸菌をはじめとして以前より研究が進んでおり、その詳細が明らかにされている。大腸菌には 2 種の複合体 II があり、嫌氣的条件下では *frd* オペロンにコードされるフマル酸還元酵素(FRD)が誘導される。ここでは NADH やグリセロールからの還元力は低ポテンシャルのナフトキノンであるメナキノン(図 4)へ伝達され、最終的に FRD によってフマル酸へと渡される。一方、好氣的な条件下では *sdh* オペロンにコードされコハク酸の酸化を触媒するコハク酸-ユビキノン還元酵素(コハク酸脱水素酵素複合体:SDH)が誘導される。SDH は呼吸系の脱水素酵素であると同時に TCA 回路の酵素でもあり、好氣的エネルギー代謝において両者を直接結ぶ接点となっている(図 5)。この様に大腸菌では二つの異なる酵素(複合体 II)が存在し、環境の酸素分圧に対応してこれらの合成の制御を通してエネルギー代謝の恒常性を維持し適応している。それでは寄生虫ではどのようなになっているのだろうか? 実は回虫成虫ミトコンドリアにおけるフマル酸還元を触媒する酵素については幼虫ミトコンドリアの SDH の逆反応であるとする意見と、大腸菌同様に SDH とは別に FRD が存在し成虫ミトコンドリアで機能しているとの見解が長い間対立し、この分野の

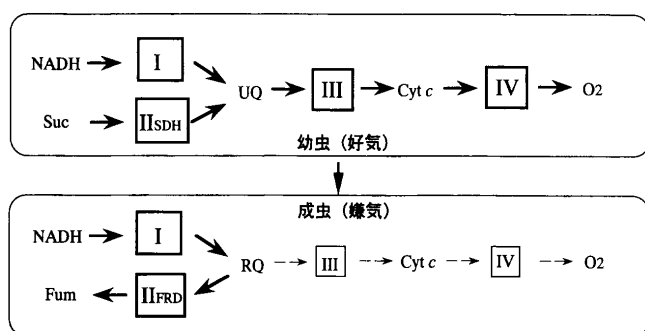


図3 回虫の生活環における呼吸鎖の変動
I~IV はそれぞれ複合体 I~IV を示す。UQ: ユビキノン,
RQ: ロドキノン。

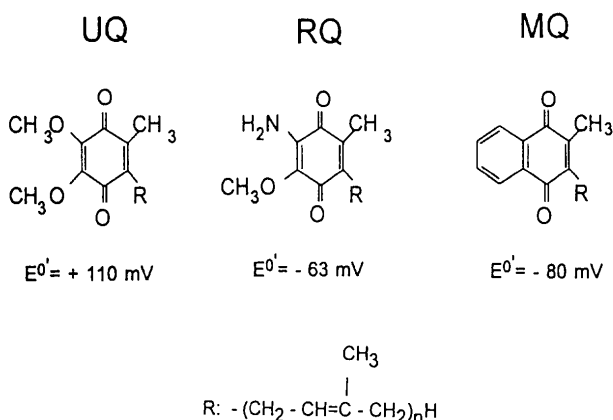


図4 呼吸系キノン類の構造と酸化還元電位

解決すべき懸案となっていた。これに対して筆者らのグループは生化学的な解析を加え、最終的な結論を得るに至った⁵⁾。

複合体 II とはコハク酸とフマル酸の酸化還元を触媒する酵素複合体の総称であり、細菌では細胞質膜に、また真核生物ではミトコンドリア内膜に局在している。そのサブユニット構造は種を通して非常に良く似ており、基本的に四つのポリペプチドから構成されている (図 6)。分子量約 70 kDa の最も大きいサイズのサブユニット (Fp) は補欠分子族として FAD を含み、これと分子量約 30 kDa で 3 種の異なるタイプの鉄-イオウクラスターを含む Ip サブユニットから比較的親水性の触媒部位が形成されている。この触媒部位は SDH ではコハク酸から PMS (phenazine methosulfate) など水溶性の電子受容体への、逆に FRD では水溶性の還元型 MV (methyl viologen) からフマル酸への電子伝達を担っている。この触媒部位が膜に安定に局在する

ためには約 15 kDa と 13 kDa から構成される 2 種の小さな疎水性のサブユニットが必要であり、多くの酵素でヘム b を含むことからシトクロム *b* サブユニット (cyb L および cyb S) と呼ばれている。この疎水性のシトクロム *b* は複合体 II とユビキノンやロドキノンなど膜中に存在する疎水性の電子伝達成分との電子の授受にも必要であり、全体としてはシトクロム *b* が膜アンカーとして膜内に局在し触媒部位はミトコンドリアではマトリックス側に、細菌では細胞質側に突出した形をとっていると考えられている。この立体構造は最近報告された大腸菌 FRD の結晶解析でも確認されたが⁶⁾、残念ながら大腸菌 FRD のアンカー部位にはヘムが含まれておらず、その詳細は今後解決すべき問題として残っている。

さて回虫の複合体 II についてミトコンドリアを単離し界面活性剤で可溶化して各種のカラムクロマトグラフィーで分離を試みたところ、幼虫と成虫では陰イオン交換クロマトグラフィーから異なった塩濃度で溶出された。またそれぞれの酵素活性について調べたところ、幼虫複合体 II は哺乳類の複合体 II と同様に SDH 活性のみを示すのに対して、成虫の酵素は SDH 活性に加え高い FRD 活性を持っていた。さらに各サブユニットのペプチドマップや抗体への反応性を比較した結果、幼虫と成虫の複合体 II において少なくとも Fp と cybS は異なっている事が判った。すなわち回虫ミトコンドリアにおいても SDH と FRD の 2 種の異なる複合体 II が存在し、好氣的なエネルギー代謝を行う幼虫では SDH、また低酸素分圧の小腸に生息する成虫は FRD を誘導して生活環境における環境の変化に対応しているのである。このようなミトコンドリアにおける複合体 II のアイソフォームの存在がはっきり示された例は哺乳類も含め初めてあり、複合体 II の多様性と言う観点からも興味深い。

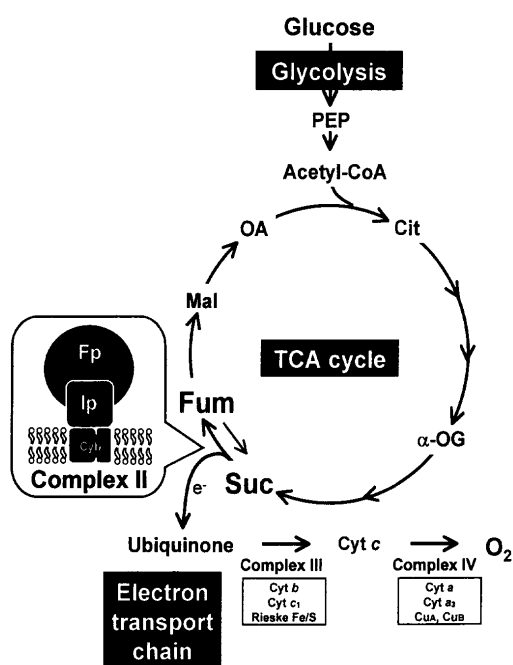


図 5 酸化的リン酸化における複合体 II の位置

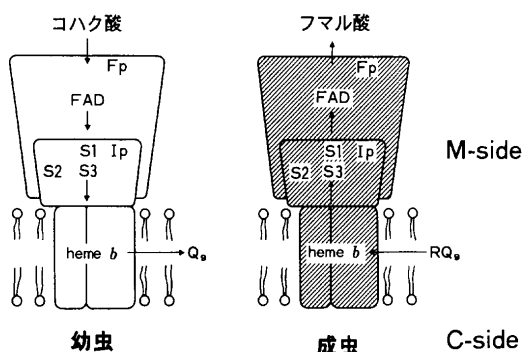


図 6 複合体 II のサブユニット構造

Fp: フラボプロテインサブユニット, Ip: 鉄-イオウクラスターサブユニット, S1~S3 は 3 種の鉄-イオウクラスターを示す。

3. 回虫成虫複合体 II の特徴

それでは成虫複合体 II の持つ高い FRD 活性はどのサブユニットのどのような一次構造上の特徴に起因するのだろうか？ この点を明らかにする目的で回虫幼虫、成虫、自由生活性線虫で好氣的なエネルギー代謝を行っている *Caenorhabditis elegans*、および哺乳類として宿主であるヒト複合体 II の各サブユニットの cDNA のクローニングを行った⁷⁻¹⁰⁾。

Fp は細菌からヒトまで非常に保存性の高いサブユニットであり、補欠分子族である FAD が共有結合している N 末端付近の His 周辺の領域や、FAD の AMP 部分と相互作用する領域は特によく保存されていた^{7,8)}。Fp は基質であるコハク酸やフマル酸の結合部位を含んでいるが、この結合や酸化還元には必須と考えられているヒスチジンやアルギニンは全ての種で保存されていた (図 7)。回虫成虫と最も高

<i>W. s. (frd A)</i>	VQFHPT	PLFP---	SGILLTEG	CRGDGG	277
<i>P. y. (frd A)</i>	VQYHPT	GL-PG--	SGILMTEG	CRGEGG	252
<i>E. c. (frd A)</i>	VQYHPT	GL-PG--	SGILMTEG	CRGEGG	253
<i>A. suum</i>	IQFHPT	GI-YG--	VGC	LITEGSRGEGG	
<i>C. elegans</i>	VQFHPT	GI-YG--	AGCLITEGSRGEGG		
Human	VQFHPT	GI-YG--	AGCLITEGCRGEGG		
Bovine	VQFHPT	GI-YG--	AGCLITEGCRGEGG		273
<i>S. cerevisiae</i>	VQFHPT	SGI-YG--	SGCLITEGAR	GEGG	307
<i>B. s. (sdh A)</i>	IQIHPT	AI-PGDD	KLRLMSES	ARGEGG	257
<i>E. c. (sdh A)</i>	WQFHPT	GI-AG--	AGVLVTEG	CRGEGG	262

図7 複合体II 基質結合部位の一次構造^{7,8)}

い相同性を示したのは幼虫 Fp であったが、この幼虫 Fp のアミノ酸配列は成虫 Fp より自由生活性の *C. elegans* に近かった(平沢他, 未発表)。また特に注目すべき点は成虫複合体 II は高い FRD 活性を示すにもかかわらず、その一次構造は大腸菌 FRD より SDH により近い性質を示した事である⁸⁾。また大腸菌 FRD と成虫 Fp に特に共通した配列も見い出されなかったが、これらの特徴は Fp ばかりでなく、Ip など成虫の他のサブユニットにも共通に見られる性質であった。

Ip は 2Fe-2S, 4Fe-4S および 3Fe-4S の3種の異なる鉄-イオウクラスターを含んでおり、これらの結合に関与する領域はフェレドキシンに見られるシステインに富んだアミノ酸配列を持っている。EPR による解析から回虫成虫の 3Fe-4S クラスターは大腸菌 FRD 同様に酸化還元電位が SDH に比べて低く、低電位の還元型ロドキノン(酸化還元電位は -63 mV) からフマル酸(+30 mV) への電子伝達を容易にしていると考えられるが、その結合部位周辺の一次構造はやはり SDH に似ていた(網野他, 投稿中)。Fp, Ip とともに種間の一次構造が良く似ている点と対応してその抗原性も共通性が高く、回虫成虫 Fp に対するポリクローナル抗体はミトコンドリアの Fp ばかりでなく細菌 Fp も認識し、またモノクローナル抗体もヒト Fp を含めほとんどの種の Fp と反応する。

一方、膜アンカーであるシトクロム *b* は種特異的性質が強く、例えば回虫成虫 cyb S に対するポリクローナル抗体は同じ寄生性線虫である犬糸状虫などの cyb S とは反応しない。実際に一次構造も種間でかなり異なっているが、機能的に重要なアミノ酸残基や膜内での配向性は保存されている。複合体 II のシトクロム *b* の二つのサブユニットは両者ともに3回膜を貫通する非常に疎水的な性質を持っており、補欠分子族であるヘム *b* は cyb L と cyb S の膜貫通部分に局在する二つのヒスチジン残基に架橋する形で結合している¹¹⁾。シトクロム *b* は幼虫ではユビキノン、成虫ではロドキノンとの電子の授受を行うサブユニットであり、キノン類との相互作用と言う観点からも重要なサブユニットである。酸化還元滴定の解析から回虫成虫複合体 II のシトクロム *b* (シトクロム *b*₅₅₈) の酸化還元電位は -34 mV で、哺乳類であるウシのシトクロム *b*₅₆₀ の -185 mV に対して高

く、この性質も低電位のロドキノンからの電子伝達を容易にしている¹²⁾。最近、*C. elegans* の変異株で酸素ストレスに高い感受性を示し寿命が短縮する *mev-1* 株の変異が複合体 II の cyb L 上に存在する事が判ったが¹³⁾、この遺伝子はアポトーシスを抑制する Bcl-2 のホモログである *ced-9* とプロモーターを共有しており¹⁴⁾、線虫複合体 II のシトクロム *b* サブユニットの生理的機能は環境からのストレスに対する応答の面からも興味深い問題である。

4. 寄生適応とミトコンドリア型フマル酸還元酵素の進化

これまで述べて来たように回虫をはじめとする多くの寄生虫は NADH-フマル酸還元系によって宿主内での嫌氣的エネルギー代謝を行っており、この中でミトコンドリアの複合体 II はフマル酸還元酵素として重要な役割を果たしている。回虫成虫 FRD 各サブユニットの cDNA クローニングを開始した当初、筆者らはその一次構造は細菌の FRD に高い相同性を持つか、あるいは両者に共通な特定の領域が存在するであろうと予想していた。しかし、すでに示した様に実際には高い FRD 活性にもかかわらず、成虫の四つのサブユニットは全て細菌 FRD より細菌やミトコンドリアの SDH に高い相同性を持っていた。この事実は次の様に考える事ができる(図8)。複合体 II の起源は地球上にまだ酸素がほとんどなかった頃に誕生した初期の嫌気性細菌の可溶性 FRD と考えられている。その後、酸素の出現により複合体 II は好氣的エネルギー代謝系の膜結合性酵素として SDH 活性を獲得し、TCA 回路と呼吸鎖を直接に結ぶ重要な役割を果たすに至った。回虫成虫 FRD の一次構造が SDH に近い事実は、これが嫌気性細菌の FRD に直接由来するのではなく *C. elegans* の様な自由生活性の線虫の SDH に由来すると考えられる。幼虫 Fp の一次構造が成虫のそれよりは *C. elegans* に似ている事はこの考え方を強く支持するものである。最近、幼虫複合体 II のサブユニットの中で Ip は成虫と同じサブユニットを使っている事が明らかになったが(網野他, 投稿中)、これは寄生性線虫成立の過程において複合体内の電子伝達のみに関与する Ip を

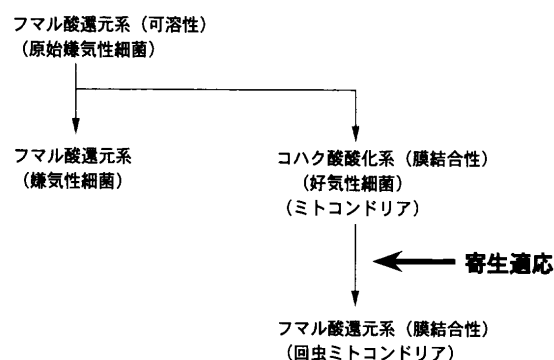


図8 複合体IIの進化

保存し、酸化還元反応の基質であるコハク酸/フマル酸およびユビキノン/ロドキシノンのそれぞれの結合部位である Fp とシトクロム *b* を変える事によって環境への適応を可能にして来たと考えられる。またこの複合体 II の進化とともにこれと直接電子の授受を行うキノン類の変化も興味深い問題である。嫌気性細菌の FRD が膜結合性となった時、これに還元力を渡したのは現在大腸菌の嫌氣的呼吸鎖で見られるナフトキノン型で酸化還元電位の低いメナキノン (-80 mV , 図 4 参照) と考えられ、これが好氣的な SDH に変化するにつれベンゾキノン型で電位の高いユビキノ ($+110\text{ mV}$) が加わった。そして現在回虫成虫に見られる様なベンゾキノン型で電位の低いロドキシノ (-63 mV) を電子供与体とする FRD が出現したと思われる。つまりロドキシノは SDH 型の一次構造を持つ回虫 FRD と同様に進化的に新しいキノンと考えられる¹⁵⁾。細菌の中にもロドキシノと FRD の組み合わせを持つものが知られているが、この FRD の遺伝子を調べてみるとやはり SDH に近いが特に回虫 FRD と共通性を示す領域や配列は見い出されなかった (宮寺他, 未発表)。この事より種々の生物種の SDH 型 FRD はそれぞれ独立に SDH から進化したと考えられる。今後、この様な機能的多様性を生み出す酵素進化の一般原則や酸素適応の分子機構の解明が期待される。また最近京都大学の三芳らによってイソプレネ側鎖の短いロドキシノの合成法が確立され、還元型ロドキシノ (ロドキノール) を基質としたフマル酸還元酵素活性の酵素学的解析も可能になった事から、この酵素の特異的な性質も近い

将来明らかになると考えられる。

原虫のエネルギー代謝

1. トリパノソーマ

寄生性原虫の中で最も研究が進んでいるのは鞭毛虫類に属する *Trypanosoma brucei brucei* である。 *T. b. brucei* はツェツェバエによって媒介されるアフリカ睡眠病の病原体であり、ヒトの寄生虫感染症としてはばかりでなく、動物、特に家畜の感染がアフリカの食糧問題におけるタンパク源の中心的な問題となっており、その対策が急がれている。鞭毛虫類は一般に一個の細胞当たりひとつのミトコンドリアを持ち、そこには RNA editing で知られているキネトプラスト DNA が局在している。これまでの研究で *T. b. brucei* のミトコンドリアはその生活環においてその構造と機能を大きく変化させる事が明らかになっている (表 1)。ベクターであるツェツェバエ中のプロサイクリック型では ATP 合成は酸化的リン酸化によって行われ、呼吸鎖や ATP 合成酵素を含みクリステの発達したミトコンドリアが機能している。一方、宿主である哺乳類の血液中に生息するトリポマスティゴート型では解糖系によるエネルギー代謝が主となるが、これはグリコソームと呼ばれる特殊なオルガネラ中で進行する。グリコソーム中には解糖系の酵素が通常の細胞内の 100 倍以上の濃度で含まれ、高い効率の反応が行われている。この解糖系の進行のためには生成した NADH の再酸化が必要であるが、これにはミトコンドリアに存在するシアン耐性のグリセロール-3-リン酸

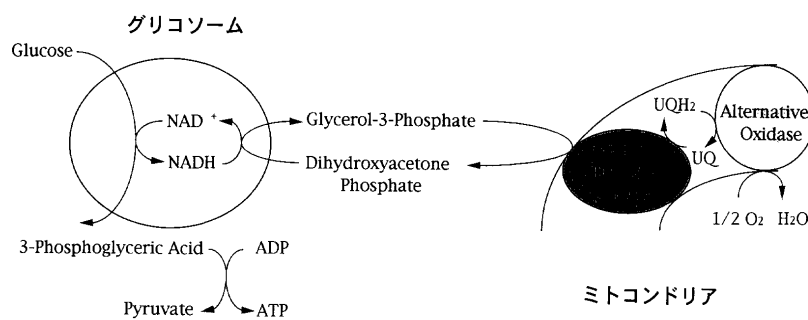


図 9 トリパノソーマのグリセロール-3-リン酸酸化系

表 1 トリパノソーマの生活環におけるエネルギー代謝系の変動

宿主	ツェツェバエ	ヒト
ステージ	プロサイクリック型	トリポマスティゴート型
		LS 型 SS 型
ミトコンドリア	活性型	不活性型 活性型
TCA 回路	+	- +
シトクロム系	+	- +
シアン耐性酸化酵素	-	+ -
ATP 合成	ミトコンドリア	グリコソーム ミトコンドリア

LS 型: long slender 型, SS 型: short stumpy 型.

化系(図9)が重要な役割を果している。この系はグリコソームで生成されたグリセロール-3-リン酸をグリセロール-3-リン酸脱水素酵素, ユビキノン, シアン耐性酸化酵素(alternative oxidase)から構成される電子伝達によって酸化する系であり, ミトコンドリア内膜に局在している。このグリセロール-3-リン酸酸化系は宿主には存在せず抗トリパノソーマ薬スラミンの阻害部位とされている。この系の末端酸化酵素であるシアン耐性酸化酵素は哺乳類やベクター中のプロサイクリック型のミトコンドリアに存在するシアン感受性のいわゆるシトクロム *c* 酸化酵素とは全く異なった構造を持っており, 補欠分子属としてヘムではなく鉄を含んでいると考えられている。最近の遺伝子レベルの研究から植物ミトコンドリアに存在するシアン耐性酸化酵素との共通性が明らかになってきたが, 酵素が不安定な事から生化学的解析は進んでいない¹⁶⁾。この酵素は宿主に存在しない点から化学療法の格好の標的と考えられ, 筆者らは後述する様に極めて特異的に作用するアスコフラノンを見い出している。この様に *T. b. brucei* のミトコンドリアは生活環の中で形態的にも機能的にも大きく変化するが, その変換の制御機構については多くの研究者の努力にもかかわらず未解明の部分が多い。宿主中のトリボマスティゴート型は感染初期は細長い LS 型であるが一部はベクターへの感染に備えて短くずんぐりした SS 型に変化し, ミトコンドリアも発達して来る。最近, このミトコンドリアの再活性化に関与すると思われるタンパク質 PIE8 が報告され注目を集めている¹⁷⁾。

2. マラリア原虫

マラリアはハマダラカによって媒介されるマラリア原虫が赤血球内に寄生し発症する原虫感染症であり, 特有の熱発作とそれに続く貧血, 脾腫が主な症状である。特効薬であったクロロキンに対する薬剤耐性マラリア原虫や媒介蚊の出現によりその死亡者は年間 300 万人以上と推定され, 最も重要な再興感染症の一つである。ヒトに感染するマラリア原虫には4種類あるが熱帯熱マラリア原虫 *Plas-*

modium falciparum と三日熱マラリア原虫 *P. vivax* が大部分を占める。図10にその生活環を示す。蚊の体内で雌雄の配偶体が接合した後, 感染型になったスポロゾイトが唾液腺に現れ, 吸血時にヒト血液に移行する。スポロゾイトは数分の内に肝臓に到達し, 肝実質細胞に侵入する。肝細胞内で赤外型原虫となり, 分裂を繰り返して約5~7日で数千から数万のメロゾイト(娘虫体)となって細胞を破壊する。メロゾイトは血中に放出され赤血球に侵入する。赤血球型は環状体, 栄養体, 分裂体と発育に伴い形態が変化し, 48時間後には8~24個のメロゾイトが形成され, 一定の周期性を持って多数の赤血球を一挙に破壊する。この時にマラリア特有の周期的な激しい悪寒と戦慄を伴った高熱の症状が現われる。ただし熱帯熱マラリアは同調化の程度が低く, 48時間に1回の発熱とはならない。メロゾイトは数十秒の間に新しい赤血球に侵入し増殖サイクルをくり返す。一部の赤血球型原虫は性的に分化して生殖母体となり, これが蚊の吸血時に蚊の体内に入り新たな感染源になる。生殖母体は蚊の中腸で受精した後, 10日~2週間程度で感染力を持ったスポロゾイトになる。三日熱および卵形マラリアでは肝臓の細胞内で長期間にわたって分裂しないまま潜伏し, 再発の原因となる休眠体(ヒプノゾイト)が見られる。最も悪性の熱帯熱マラリアでは原虫が感染した赤血球が脳, 肺, 肝臓などの毛細血管に付着し, 血管内皮細胞の破壊, および感染赤血球の凝集により組織が酸素欠乏に陥り, 変性, 壊死を起こして重症化する。

これまで赤血球内型マラリア原虫のエネルギー代謝は主に解糖系による ATP 産生が中心と考えられ, ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系および ATP 合成酵素の生理的意義は明確ではなかった。しかし熱帯熱マラリア原虫ミトコンドリア DNA の塩基配列が決定され, また生化学的な解析がある程度可能となった事から, その特異的な性質が明らかになってきた。通常, 哺乳類では約 16,000 塩基対の環状 DNA 上に酸化的リン酸化に必要な 13 種のタンパク質, 2 種のリボソーム RNA および 22 種の tRNA がコードされているが, マラリア原虫ミトコンドリア DNA は 6000 塩基対と短く, タンパク質としてはシトクロム *b* および末端酸化酵素であるシトクロム *c* 酸化酵素のサブユニット I と III の遺伝子の 3 種のみで, リボソーム RNA は分断されており tRNA はない。このような宿主との相違点は化学療法剤の標的として期待され, 最近英国で開発されたアトバコン Atovaquone の作用点もミトコンドリアの電子伝達系と考えられている。アトバコンはクロロキン耐性株にも有効であり, すでにアフリカやタイなどの流行地で治療に用いられている。その標的はピリミジン生合成系の酵素でミトコンドリアに局在するジヒドロオロト酸脱水素酵素あるいは電子伝達系の複合体 III (ユビキノ-シトクロム *c* 還元酵素)ではないかと考えられている¹⁸⁾。このアトバコンはマラ

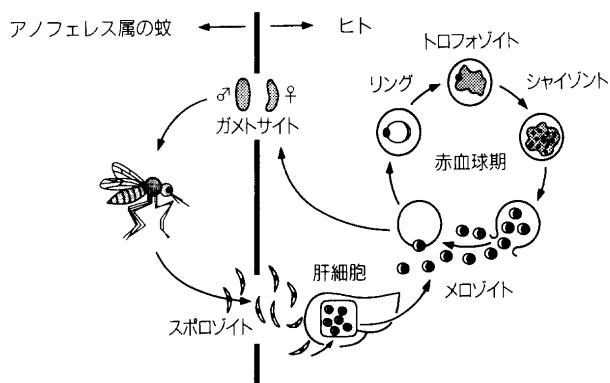


図10 マラリア原虫の生活環³²⁾

リア原虫と同じ孢子虫類に属し日和見感染の代表的な例であるトキソプラズマにも有効である事が判って来たが、生化学的な解析からその作用点がやはりミトコンドリア複合体 III のシトクロム *b* と報告されている¹⁹⁾。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたものであり、これが研究の進展を妨げている。そこで筆者らはマラリア原虫ミトコンドリアの生化学的解析と同時に遺伝子レベルでの解析を開始した。まず研究の遅れている三日熱マラリア原虫のシトクロム *c* 酸化酵素について、サブユニット III をコードする COIII 遺伝子のクローニングを行ない他の生物種と比較した結果、その一次構造が宿主のそれと非常に異なっている事が明らかになった²⁰⁾。サブユニット III は哺乳類ミトコンドリアなどでは七つの膜貫通ヘリックスを持っているが、N 末端、ヘリックス II、ヘリックス III と IV の間の親水性ループ領域にマラリア原虫特異的な欠失が認められた (図 11)。さらに C 末端付近には大きな挿入が見られ、電子伝達反応や酵素のアセンブリーにおいて宿主と大きく異なっていると考えられる。また患者血液より得た三日熱マラリア原虫 mRNA を用いた RT-PCR から COIII 遺伝子が赤血球内型で発現している事が確認され、ミトコンドリア内でシトクロム *c* 酸化酵素が機能している事が強く示唆された。さらに引き続いてミトコンドリアのマーカ酵素である複合体 II について解析を

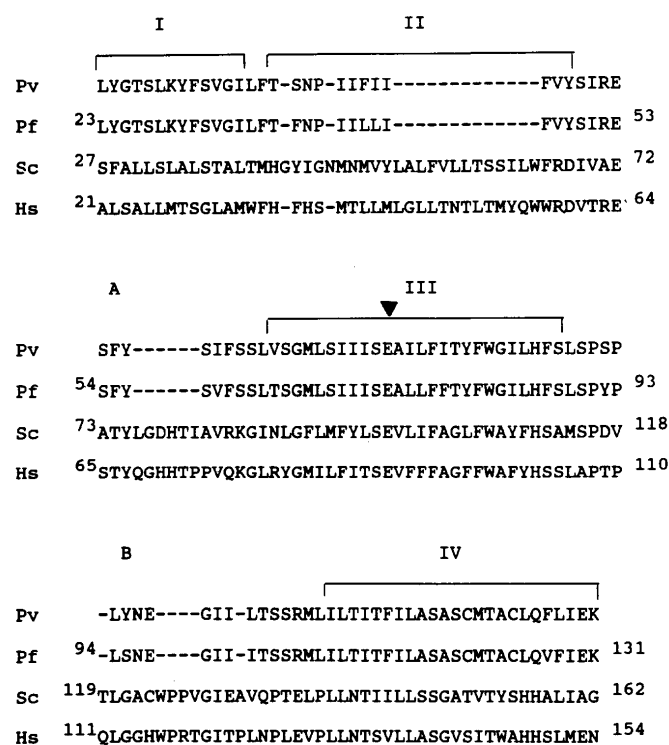


図 11 マラリア原虫シトクロム *c* 酸化酵素サブユニット III に特有な欠失²⁰⁾

Pv: 三日熱マラリア原虫, Pf: 熱帯熱マラリア原虫, Sc: 出芽酵母, Hs: ヒト。

I~IV は膜貫通領域, A と B は親水性の領域を示す。▼は種間で保存性の高いグルタミン酸。

進めている。英国の Fry は NADH-シトクロム *c* 酸化還元酵素活性に対するフマル酸の影響などから SDH, FRD 両者の存在を提案している。しかしこの点に対する生化学的、酵素学的な情報は全く得られておらず、前述の回虫の場合と異なってその実体は明らかになっていない。そこで筆者らは触媒部位を形成するフラボプロテインサブユニット (Fp) および鉄-イオウクラスターサブユニット (Ip) についてその遺伝子のクローニングを行って全塩基配列を決定した。塩基配列から予想したアミノ酸配列において活性の発現や補欠分子族の結合に必要なアミノ酸残基は全て保存されていたが、マラリア原虫に特有の挿入や欠失が見い出された。またそのアミノ酸配列を大腸菌の SDH および FRD と比較したところ、Fp, Ip ともに FRD より SDH に類似していた。現在のところゲノムサザンプロットやノーザンプロットの結果からは 2 種の複合体 II の存在を示す結果は得られていない (竹尾他, 投稿中)。最近、この両サブユニットを大腸菌内で SDH 活性を持った組換え酵素として発現する事に成功した。この活性は哺乳類複合体 II の阻害剤 TTFA で全く影響を受けず、マラリア原虫複合体 II が宿主の酵素と極めて異なった性質を持っている事が判った。大腸菌での発現系は複合体 II を標的とする新規抗マラリア剤のスクリーニング系として大いに期待される。

3. ミトコンドリアを持たない寄生原虫

これまで述べて来た寄生虫は全てそのエネルギー代謝に何らかの形でミトコンドリアが関与している。しかし一方、寄生性原虫の中にはミトコンドリアを持たないものも数多く存在する。例えばアメーバ性赤痢の病原体である赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica*, 下痢症を起こすランブル鞭毛虫 *Giardia lamblia* また膣トリコモナス *Trichomonas vaginalis* などである。これらの原虫はいずれも酸素分圧の低い嫌気的な環境に生息し、以前はランブル鞭毛虫や膣トリコモナスはミトコンドリアをこれまでに一度も持った事のないグループと考えられていた。しかし核にコードされておりミトコンドリア由来と考えられているバリル-tRNA 合成酵素がこれらの原虫にも存在する事が判り、一度はミトコンドリアを持っていた時期があり、現在ではこれを失っていると言う事が明らかになった²¹⁾。また最近、ミトコンドリア型熱ショックタンパク質の細胞内局在の解析から赤痢アメーバの細胞質中に「Mitosome」あるいは「Crypton」と呼ばれるミトコンドリア由来と考えられるオルガネラが見い出されている^{22,23)}。その生理的機能は不明だが、ミトコンドリアの起源や細胞進化の観点からも今後の研究の進展が期待される。

さて、それではこれらミトコンドリアを持たない寄生性原虫はどのようなエネルギー代謝を行っているのだろうか？ 活発に増殖を行っているランブル鞭毛虫や膣トリコモナス

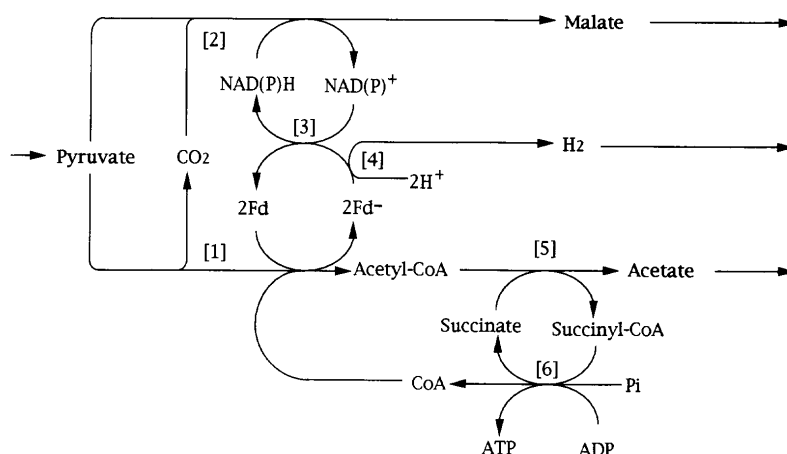


図12 膾トリコモナスにおける基質レベルのATP合成経路

[1]Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase, [2]malate dehydrogenase: decarboxylating, [3]NADP-ferredoxin oxidoreductase, [4]hydrogen-ferredoxin oxidoreductase (hydrogenase), [5]acetate-succinyl CoA transferase, [6]succinate thiokinase.

の栄養型はヒドロゲノソームと呼ばれるオルガネラを持っている。ここで解糖系によりグルコースから生成したピルビン酸を基質として酢酸を生成し、その間に基質レベルのリン酸化反応によってATPを合成する(図12)。この代謝系の特徴は水素イオンを還元して分子状水素を放出するヒドロゲナーゼの存在であり、嫌気性細菌の系と非常に良く似ている。実際に、ピルビン酸-フェレドキシン酸化還元酵素やフェレドキシンの一次構造は細菌のそれに非常に近く、遺伝子の水平移動によって獲得されたと考えられる²⁴⁾。ヒドロゲノソームは二重膜を持ち、ピルビン酸からATPを合成する点ではミトコンドリアに近い性質を持っているが、一方シトクロムやTCA回路、また固有のDNAを含んでいない。この様な性質からペルオキシゾームとの関連を提唱する研究グループも少なくなかった。しかしヒドロゲノソームに局在する熱ショックタンパク質の解析から、現在ではこれがミトコンドリアと共通の祖先から出現したと考えられている²⁵⁾。赤痢アメーバにおいてはヒドロゲノソームの存在はまだ結論が出ていないが、少なくとも細胞レベルでこの系の存在が生化学的に証明されている²⁶⁾。この様な嫌氣的ATP合成系は宿主である哺乳類は持っておらず、これらの寄生性原虫の特効薬として知られているメトロニダゾールの標的となっている。すなわちメトロニダゾールは原虫の還元型フェレドキシンにより還元されて活性化され、生じたラジカルが原虫を殺滅する。

おわりに

以上、述べて来た様に寄生虫は宿主とは大きく異なった多様なエネルギー代謝系を持ち、これによって宿主内の特殊な環境に適応している。哺乳類の低酸素状態に対する応答の制御機構についてはhypoxia-inducible factor (HIF)などの関与が明らかになりつつあるが²⁷⁾、この領域に関する

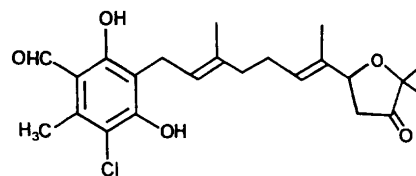


図13 アスコフラノン

寄生虫についての分子レベルでの研究はまだ始まったばかりである。我々は本稿で述べた回虫が生活環において極めて明確な代謝系の変換を示すことから、研究のモデル系として大いに期待できると考えている。また前項でも述べた様に宿主と異なった寄生虫の代謝系は化学療法の格好の標的となる。特にエネルギー代謝は生命活動の維持に不可欠な重要な系であり、その阻害剤は極めて有効な抗寄生虫薬となる。この点から特異的な機能を持つ寄生虫ミトコンドリアはこれまでも多くの研究者によって解析されて来たが、この中で筆者らは血流中のアフリカ型トリパノソーマを極めて低濃度で、しかも短時間で殺滅する薬剤アスコフラノン(図13)を見出した²⁸⁾。実際に血流中の原虫は投与後数分で形態的な変化を見せ始め、30分後にはほとんど全てが消失してしまうと言う劇的な効果を示す²⁹⁾。アスコフラノンはマクロファージに抗癌作用を与える化合物として微生物より見い出されたが、この標的が原虫ミトコンドリアに存在するシアン耐性の末端酸化酵素である事が原虫ミトコンドリアを用いた実験で明確になった²⁸⁾。この酵素は非常に不安定で阻害機構の詳細などの研究は困難であったが最近大腸菌内での組換え酵素の発現が可能となり、生化学的な解析や新しい誘導体のスクリーニングを進める事ができるようになった³⁰⁾。また線虫はヒトや動物に寄生して障害を与えるばかりでなく、農作物や有用植物に大きな被害をもたらしているが、自由生活性から寄生性に至るまで線虫の多くの遺伝子とその産物の性質は非常に似た性質を持つ

ている。全遺伝子の塩基配列の明らかになった *C. elegans*³¹⁾ と生化学的解析の進んでいる回虫の系の有機的な組み合わせによって、新しい抗線虫薬の開発も進められている。この中で新しい標的の探索とこの標的に対する結晶解析に基づく薬剤の分子設計 (Structure based drug design) は今後の主要な戦略になって行くと考えられる。未だに多くの途上国の人々がマラリアや住血吸虫症、またフィラリア症などに苦しんでおり、さらに先進国においても免疫抑制剤や抗癌剤の使用、AIDS に起因する日和見感染によるトキソプラズマ症やカリニ肺炎などの寄生虫感染症が増加している。加えて、これまでの「特効薬」に対する耐性株の出現が大きな脅威となって広がりつつある。わが国はフィラリア症に対して世界的に広く利用されているアイバメクチンを見出した実績と経験を持っており、寄生適応に関する基礎研究から得られる新しい知見に基づく生物学的成果とその臨床応用への展開に関し、わが国の研究に対する内外の期待と科学先進国としての責務は大きい。

本稿の中で一部述べた筆者らの研究は文部省科学研究補助金および厚生省厚生科学研究費によって行われているが、これは寄生虫学の基礎研究に対する理解の進展を現わすものであり、あらためて謝辞を表したい。

引用文献

- 丸山工作：生命現象を探る—生化学の創始者達—，中央公論社，1972
- K. Kita, H. Hirawake & S. Takamiya: *Int. J. Parasitol.* **27**, 617 (1997)
- 大家 裕：最新医学 **44**, 686 (1989)
- A. Tielens & J. Van Hellemond: *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 71 (1998)
- F. Saruta, T. Kuramochi, K. Nakamura, S. Takamiya, Y. Yu, T. Aoki, K. Sekimizu, S. Kojima & K. Kita: *J. Biol. Chem.* **270**, 928 (1995)
- T. Iverson, C. Luna-Chavez, G. Cecchini & D. Rees: *Science* **284**, 1961 (1999)
- H. Hirawake, H. Wang, T. Kuramochi, S. Kojima & K. Kita: *J. Biochem.* **116**, 221 (1994)
- T. Kuramochi, H. Hirawake, S. Kojima, S. Takamiya, R. Furushima, T. Aoki, R. Komuniecki & K. Kita: *Mol. Biochem. Parasitol.* **68**, 177 (1994)
- F. Saruta, H. Hirawake, S. Takamiya, Y.-C. Ma, T. Aoki, K. Sekimizu, S. Kojima & K. Kita: *Biochim. Biophys. Acta* **1276**, 1 (1996)
- H. Hirawake, M. Taniwaki, A. Tamura, S. Kojima & K. Kita: *Cytogenet. Cell Genet.* **79**, 132 (1997)
- K. Nakamura, M. Yamaki, M. Sarada, S. Nakayama, C. R. T. Vibat, R. B. Gennis, T. Nakayashiki, H. Inokuchi, S. Kojima & K. Kita: *J. Biol. Chem.* **271**, 521 (1996)
- S. Takamiya, K. Kita, K. Matsuura, R. Furushima & H. Oya: *Biochem. Int.* **21**, 1073 (1990)
- N. Ishii, M. Fujii, P. S. Hartman, M. Tsuda, K. Yasuda, N. Senoo-Matsuda, S. Yanase, D. Ayusawa & K. Suzuki: *Nature* **394**, 694 (1998)
- M. Hengartner & H. R. Horvitz: *Cell* **76**, 665 (1994)
- A. Hiraishi, Y. K. Shin & J. Sugiyama: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**, 99 (1995)
- M. Chaudhuri, W. Ajayi & G. C. Hill: *Mol. Biochem. Parasitol.* **95**, 53 (1998)
- D. Perez-Morga & E. Pays: *Mol. Biochem. Parasitol.* **101**, 161 (1999)
- I. K. Srivastava, H. Rottenberg & A. B. Vaidya: *J. Biol. Chem.* **272**, 3961 (1997)
- A. E. Vercesi, C. O. Rodrigues, S. A. Uyemura, L. Zhong & S. N. Moreno: *J. Biol. Chem.* **273**, 31040 (1998)
- P. K. C. Lim, Y. Watanabe, T. S. Kian, T. Furuta, T. Aoki, S. Kojima, K. Kita, Y. D. Sharma & M. J. Wah: *Jpn. J. Parasitol.* **45**, 373 (1996)
- T. Hashimoto, L. Sanchez, T. Shirakura, M. Muller & M. Hasegawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6860 (1998)
- J. Tovar, A. Fischer & C. G. Clark: *Mol. Microbiol.* **32**, 1013 (1999)
- Z. Mai, S. Ghosh, M. Frisardi, B. Rosenthal, R. Rogers & J. Samuelson: *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2198 (1999)
- B. Rosenthal, Z. Mai, D. Caplivski, S. Ghosh, H. Vega, T. Graf & J. Samuelson: *J. Bacteriol.* **179**, 3736 (1997)
- E. T. Bui, P. J. Bradley & P. J. Johnson: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9651 (1996)
- M. Muller: *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2879 (1993)
- V. Srinivas, X. Zhu, S. Salceda, R. Natamura & J. Caro: *J. Biol. Chem.* **273**, 18019 (1998)
- N. Minagawa, Y. Yabu, K. Kita, K. Nagai, N. Ohta, K. Meguro, S. Sakajo & A. Yoshimoto: *Mol. Biochem. Parasitol.* **81**, 127 (1996)
- Y. Yabu, N. Minagawa, K. Kita, K. Nagai, M. Honma, S. Sakajo, T. Koide, N. Ohta & A. Yoshimoto: *Parasitol. Int.* **47**, 131 (1998)
- Y. Fukai, H. Amino, H. Hirawake, Y. Yabu, N. Ohta, N. Minagawa, S. Sakajo, A. Yoshimoto, K. Nagai, S. Takamiya, S. Kojima & K. Kita: *Comp. Biochem. Physiol.* **124**, 141 (1999)
- The *C. elegans* sequencing consortium: *Science* **282**, 2012 (1998)
- 堀井俊宏：病気のバイオサイエンス，大阪大学出版会，1995

略歴

北 潔

生年月日：昭和 26 年 1 月 26 日

略 歴：昭和 49 年 3 月 東京大学薬学部製薬化学科卒業

55 年 3 月 東京大学薬学系大学院博士課程修了

55 年 4 月 東京大学理学部・植物学教室助手

58 年 4 月 順天堂大学医学部・寄生虫学教室

(大家 裕教授) 助手

62 年 8 月 同講師

平成 3 年 1 月 東京大学医科学研究所・寄生虫研究部助教授

10 年 3 月 東京大学大学院・医学系研究科 (国際保健学専攻・生物医化学教室) 教授

研究テーマ：エネルギー代謝における酸素適応機構について寄生虫やヒト，特に呼吸鎖電子伝達系の多様性に焦点を絞って研究を行っています。この様な基礎研究が抗感染症薬の開発，代謝病や生活習慣病の治療に実際に貢献する事を目標としています。

趣 味：「旅行」。しかしここ 10 年，純粋な「旅行」はしていません。