

2. 酸素適応における回虫 *Ascaris* ミトコンドリア 複合体IIの役割 — 構造・機能とその発現 —

北 潔

(掲載決定:平成3年8月7日)

I. はじめに

種々の寄生虫は寄生生活への適応進化の過程において宿主内の環境に適応し、宿主特異性や臓器特異性を備えるようになった。エネルギー転換系のような全生物に共通の代謝系の適応や進化、また基本的な反応機構を理解するうえで寄生虫は最適な研究対象のひとつと考えられる。われわれは宿主哺乳類の小腸という低酸素分圧の環境に生息する回虫 *Ascaris* の成虫が嫌氣的なエネルギー代謝を行い、そのミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系は哺乳類のそれとは非常に異なった構成になっている点を明らかにした(大家, 1989)。そして生化学的な解析から代謝系の中でフマル酸還元酵素として機能する複合体IIが重要な役割を果たしていることが判ってきた(大家, 1990)。ここではさらにその特徴を調べ、構造と機能について明確にするために行っている分子生物学的アプローチについて概説する。

II. 回虫のエネルギー代謝と複合体II

嫌氣的グルコース分解の最終産物としてコハク酸を蓄積するホスホエノールピルビン酸(PEPCK)ーコハク酸経路は蠕虫のみならず、トリパノソーマなどの原虫にも広く分布している。この代謝系の最終ステップであるフマル酸のコハク酸への還元を触媒するフマル酸還元酵素の実体は長年のこの領域の研究者の間の懸案であったが、われわれはこれがミトコンドリア電子伝達系の複合体IIであることを明確にしてきた(Takamiya *et al.*, 1986; Kita *et al.*, 1988a)。複合体IIは通常コハク酸ーユビキノン酸化還元酵素と呼ばれ、哺乳類など好気性生物においてはTCA回路系の酵素中唯一の膜結合性酵素としてコハク酸をフマル酸へ酸化すると同時にこの還元力を膜中に存在する疎水性のキノン類へ伝達する反応を触媒している。複合体IIは一般的に種を通して共通のサブユニット構造を持ち、4種のポリペプチドより構成されている。分子量約70kDaの最も大きいポリペプチドはFADを補欠分子族として含みFpサブユニットと呼ばれている。ここで基質であるコハク酸の酸化が行われ

る。次に大きな分子量約28kDaのサブユニットは3種の異なるタイプの鉄ーイオウ中心(非ヘム鉄)を含んでおりIpサブユニットと呼ばれている。このサブユニットはFADからの電子を受取り、DCIP(ジクロロフェノールインドフェノール)など水溶性の電子受容体へ伝達する機能を持っている。つまりこのFpおよびIpサブユニットから、いわゆるコハク酸脱水素酵素活性(SDH)を示す触媒部位が形成されている。この2種のポリペプチドは膜タンパク質としては比較的親水性の性質を持っており、この触媒部位が膜に安定に結合するためには約15kDaと13kDaより構成される2種の小さな疎水性のサブユニットが必要である。この疎水性サブユニットにはヘムbが結合し、シトクロムbとして分光学的に同定することができ、それぞれcybL, cybSと呼ばれている(Kita *et al.*, 1991)。このような基本構造は嫌氣的エネルギー代謝を行っている寄生性の動物でもほぼ同様であるが、しかし寄生虫ミトコンドリアの複合体IIは逆反応のフマル酸還元酵素活性を合わせ持ち、複合体I(NADHーユビキノン酸化還元酵素)と共に形成される嫌氣的呼吸鎖電子伝達系であるNADHーフマル酸酸化還元系の末端酸化酵素として機能している。以上の点を模式的に図1に示した。

われわれは回虫成虫筋ミトコンドリアより複合体IIを精製し(Takamiya *et al.*, 1986)高いフマル酸還元活性を持つことを見出した(Kita *et al.*, 1988a)。さらに複合体IとIIの間の電子伝達には酸化還元電位の低いロドキノンが必須であることを単離した複合体及びキノン類のリボソームへの再構成実験から示し、複合体IIの嫌氣的エネルギー代謝における生理的意義を明らかにしてきた(Kita *et al.*, 1988b)。一方、回虫はその生活環において卵の発生に酸素を必要とし、感染幼虫である第二期幼虫にいたる時期は好氣的エネルギー代謝を行い、そのミトコンドリア呼吸系は哺乳類同様と考えられている。事実幼虫ミトコンドリアにはシトクロム酸化酵素が観察され、複合体IIのフマル酸還元酵素活性は低く、免疫化学的解析から成虫の酵素とは異なったアイソザイムの存在を示唆する結果も得られている。このような回虫複合体IIの性質を哺乳類のそれと比較しつつ生化学的、タンパク質化学的な面から詳細に調べてきたが(F

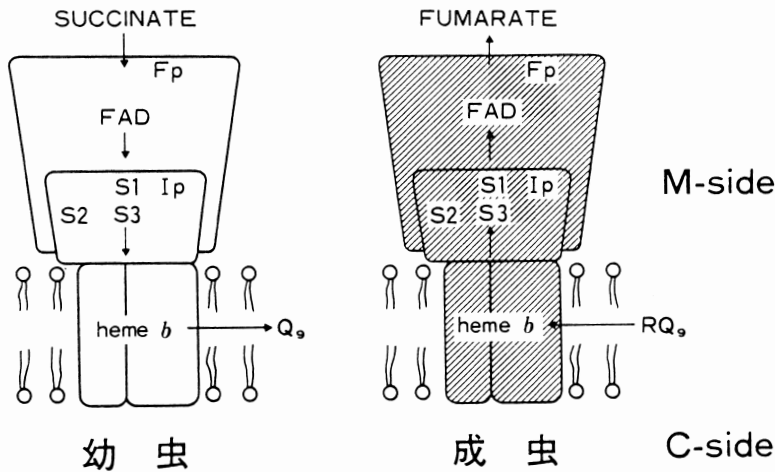


図1 回虫複合体IIの構造：S1～S3はそれぞれ鉄-イオウ中心を表す。Q₉、RQ₉はそれぞれユビキノール-9、ロドキノール-9を表す。

urushima *et al.*, 1990 ; Takamiya *et al.*, 1990), さらに各サブユニットの構造と機能を明らかにし, 酵素反応の方向性の決定要因などの特徴や寄生現象成立過程におけるエネルギー転換系の進化適応について理解するためには各サブユニットの一次構造についての情報が必須である。また環境の変化に対応した生合成の調節機構を調べるうえで酵素の遺伝子の染色体上での構造を知る必要がある。しかし遺伝子の全塩基配列が判明している大腸菌など細菌の場合と異なり, 哺乳類も含めミトコンドリアの複合体IIに関する遺伝学的情報は皆無であった。以上の理由から, 回虫及び哺乳類ミトコンドリア複合体IIを構成する全サブユニットに対するcDNA (相補的DNA)のクローニングを開始した。

Ⅲ. 回虫成虫筋λgt11cDNAライブラリーの作成と抗体によるスクリーニング

あるタンパク質の遺伝子やcDNAを得るためにはいくつかの方法がある。そのタンパク質のアミノ酸配列から演繹される配列のDNAを合成しプローブとする場合, また他の生物種で同じ機能を持つタンパク質の一次構造において, その触媒部位や基質結合部位など相同性が高い領域に対するプローブを作成してスクリーニングする場合がある。さらに, 目的のタンパク質に対する特異性の高い抗体があれば発現ベクターに組み込んだcDNAライブラリーを用いて実際にタンパク質を合成させ, フィルター上の抗原抗体反応によって目的とするタンパク質のcDNAクローンを同定することができる。材料として微量の試料しか得ることのできない寄生虫の場合, 相同性に関する情報の少ないタンパク質について

は抗体を用いたcDNAライブラリーのスクリーニングによる方法が有用と考えられる。われわれは回虫成虫筋及びウシ心筋の複合体IIの全サブユニットに対する抗体をすでに作成しているのでこの方法をとった。われわれが対象としている寄生虫では市販のcDNAライブラリーがないので, われわれ自身で質の高いcDNAライブラリーを作成する必要がある。以下にcDNAライブラリーの作成と抗体によるスクリーニングの概略を述べる。これらの基本操作については多くの成書に詳しく記載されているので(松村正実, 1990など), ここでは特に注意すべき点を中心に説明する。

質の高いcDNAライブラリーの作成には intactな mRNA の調製が必須の条件となる。まず最初に全 RNA の抽出を行うが, RNA は RNase による分解を受けやすく, DNA の調製に比べてはるかに注意を要する。培養細胞や肝臓などでは比較的容易に分解の少ない RNA の抽出が可能であるが, 回虫成虫筋の場合, チオシアン酸グアニジン存在下で凍結試料をワーリングブレンダーにより破碎する方法が最も有効であった。これを塩化セシウムで遠心し全 RNA 画分を沈殿として得た。さらにオリゴ d (T) セルロースカラムによりポリ A を 3' 末端に持っている mRNA を精製した。この mRNA より逆転写酵素を用いて合成した cDNA の両端に EcoRI リンカーを結合させ, ファージベクターである λgt11DNA の EcoRI 部位へ挿入した。この DNA 画分を λファージのタンパク質コート画分と混合することにより *in vitro* パッケージを行い, cDNA の産物が β-ガラクトシダーゼと融合タンパク質として発現される λgt11cDNA ライブラリーを作成した。このライブラリーを回虫成虫筋

ミトコンドリア複合体IIの各サブユニットに対する抗体でスクリーニングを行った。1枚のプレートに約10⁴個のプラークを作り、IPTG (イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド)で融合タンパク質を誘導後ニトロセルロースフィルターに写しとる。この後の操作は免疫ブロッティングと全く同一である。感度の点からは¹²⁵Iで標識した二次抗体が適当であるが、操作性と時間的な点も考えた結果、現在はアルカリホスファターゼ法を用いている。陽性クローンが検出された場合、このファージDNAよりEcoRI断片を切り出して塩基配列決定用のpUC118などのプラスミドにサブクローンする。ここで陽性クローンが目的とするものかどうかを調べるため、融合タンパク質に対する抗体をスクリーニングに用いた抗体画分より単離し、これを用いて行った免疫ブロッティングで目的とするタンパク質と同じ分子量のバンドが検出されることを確認しておいた。こうして現在までに回虫Fp, cybL及びcybS, ヒトFp, Ip, cybLに対するクローンを得ている。この中でcDNAの全塩基配列の決定が完了したヒト鉄-イオウ中心サブユニット (Ip) について次節で述べる。

IV. ヒト複合体II Ipサブユニットのクローニング

IpサブユニットはFpサブユニット上のFADからの還元力を受けとり、次の電子伝達成分であるシトクロムbまたはキノン類へ伝達する機能を果たしている。Ipサブユニットに含まれている鉄-イオウ中心はS-1, S-2, S-3と呼ばれ、EPRやMCDの解析からそれぞれ[2Fe-2S], [4Fe-4S]及び[3Fe-4S]

のクラスタータイプと考えられている。われわれはEP Rの実験から回虫IpサブユニットのS-3クラスターの酸化還元電位が細菌のフマル酸還元酵素のそれに近い事実を見い出しており (Hata-Tanaka *et al.*, 1988), 現在最も興味を持って研究を進めているサブユニットである。図2はわれわれが決定したヒト肝Ip cDNAの塩基配列から予想されるアミノ酸配列 (Kita *et al.*, 1990)をペプチドの分析より決定したウシ心筋 (Yao *et al.*, 1986), 及びDNAの塩基配列より予想した大腸菌のそれ (Darlison *et al.*, 1984)と比較した結果を示している。ここに挙げた3種はどれもコハク酸酸化系として機能しており、高い相同性を示している。特に太線で示した部分はシステインに富んでおり、鉄-イオウ中心結合部位と考えられる。実際にこの領域は植物や細菌のフェレドキシンの鉄-イオウ中心結合部位と高い相同性を示しており、そのタイプの特徴からN末端側から順に、S-1, S-2, S-3の結合部位と考えられる。ここで見られるフェレドキシンとの相同性はIpがフェレドキシンにその起源を発することを示している。われわれのヒト肝Ipの結果はミトコンドリア複合体IIに関する塩基配列では最初の報告であるが、その直後にカルフォルニア大学のグループによって決定された酵母Ipの配列も非常に相同性の高いものであった。(Lombardo *et al.*, 1990)。

V. cDNA-PCR法による回虫複合体II IpサブユニットcDNAの解析

前に述べた様に回虫, ヒト複合体IIのサブユニットの

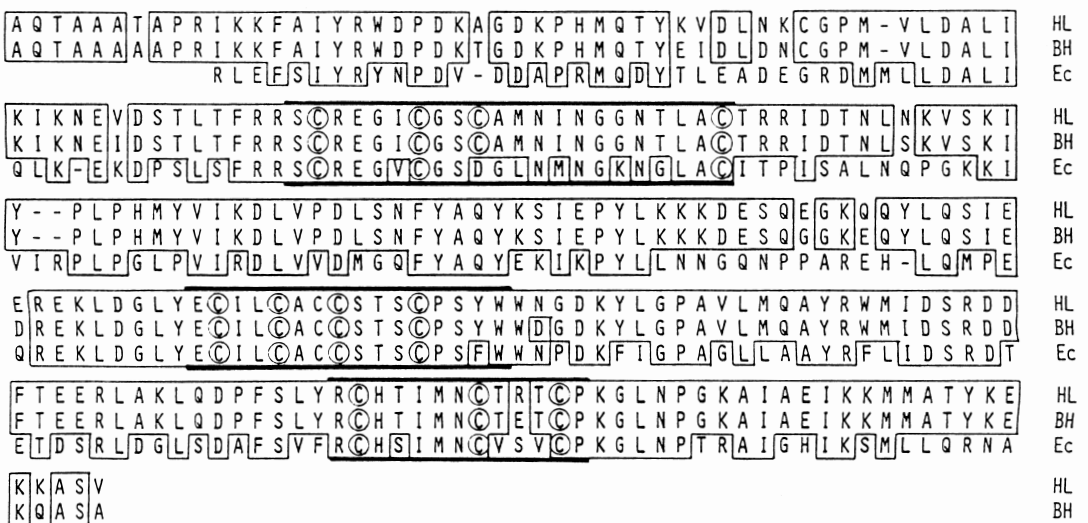


図2 複合体IIのIpサブユニットの相同性と鉄-イオウ中心結合部位: HLはヒト肝, BHはウシ心筋, Ecは大腸菌 *sdh B* 遺伝子産物を示す。太線がそれぞれN末端側よりS-1, S-2, S-3の結合部位。

大部分は抗体により陽性クローンが検出され、その塩基配列決定が現在進行中である。しかし、この中で回虫 Ip サブユニットについては特異性の高い抗体を用いて何度スクリーニングを試みても陽性クローンを得ることができなかった。そこでわれわれの決定したヒト Ip, またその後報告のあった酵母 Ip, さらに以前より塩基配列の判っている細菌 Ip の相同性の高い部分を利用し、実際には PCR 法を用いて cDNA の塩基配列決定を行うこととした (Innis *et. al.*, 1990)。まず最初に相同性の特に高いシステインに富む 3 ケ所の領域のうち N 末端側に近い S-1 結合部位と C 末端側に近い S-3 結合部位に対するプライマーを上記の生物種の Ip サブユニットの塩基配列を参考にして作成した。そして逆転写酵素により回虫筋 mRNA から cDNA を合成し、これをテンプレートとして 2 種のプライマー間で PCR を行った。その結果、予想される約 480 塩基対の PCR 産物が確認された。次にこの PCR 産物の塩基配列を直接塩基配列決定法により決定した。PCR 法の数少ない欠点のひとつとして数百塩基対に 1 塩基の割合で誤った塩基が入る点があり、サブクローンをを行った後の配列決定の問題点となっている。しかしこれは PCR 産物を直接塩基配列決定することで解決される。また最近、非放射性の実験系という観点から蛍光標識を用いた DNA 塩基配列決定法が改良され、その感度、決定できる塩基数も放射性同位元素を用いた系と同程度になりつつあることから、このシステムを利用し、ダイターミネーター法により決定を行っている。現在までに S-1 と S-3 結合部位の間に存在する S-2 結合部位を含む約 350 塩基対の領域の配列が決定できた。このうち S-2 結合部位の近傍の配列を図 3 に示す。回虫複合体 II は哺乳類と異なり高いマル酸還元酵素活性を示すにもかかわらず、そのアミノ酸配列は細菌で明らかになっているマル酸還元系の配列よりも哺乳類や大腸菌のコハク酸酸化系に近い性質を持っていた。これは回虫成虫複合体 II がその生理的機能として持っているマル酸還元酵素活性は直接細菌に由来するものではなく、一旦好氣的環境に適應して形成された真核生物のミトコンドリアにおけるコハク酸

酸化系としての複合体 II が、寄生という環境の変化に対応して新たに獲得した性質と考えることができる。現在、残っている N 末端側に関してはペプチドから決定したアミノ酸配列より予想して作成したプライマーと S-2 結合部位に対するプライマー、また C 末端側については S-2 結合部位に対するプライマーとポリ T をプライマーとして PCR を行い、その塩基配列決定を進めている。今後他のサブユニットの一次構造の解明を進め、酵素活性を発現するための基本的な一次構造上の特徴やその進化的意義について考察を深め、寄生現象の成立過程の本質に迫っていきたくと考えている。

本研究の大部分は順天堂大学医学部寄生虫学教室において行ったもので、大家裕名誉教授、青木孝教授に深く感謝致します。また同研究室の高宮信三郎、古島理江子、王華、桧山由美子、八巻真理子、皿田巳子の各氏、東京大学医科学研究所寄生虫研究部の小島莊明教授、帝京大学医学部笠原道弘教授及び順天堂大学中央機器分析室の皆様にも深く感謝致します。

文 献

- 1) Darlison, M. G. and Guest, J. R. (1984) : Nucleotide sequence encoding the iron-sulphur protein subunit of the succinate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 223, 507-517.
- 2) Furushima, R., Kita, K., Takamiya, S., Konishi, K., Aoki, T. and Oya, H. (1990) : Structural studies on three flavin-interacting regions of the flavoprotein subunit of complex II in *Ascaris suum* mitochondria. *FFBS Lett.*, 263, 325-328.
- 3) Hata-Tanaka, A., Kita, K., Furushima, R., Oya, H. and Itoh, D. (1988) : ESR studies on iron-sulfur clusters of complex II in *Ascaris suum* mitochondria which exhibits strong fumarate reductase activity. *FEBS Lett.*, 242,

Pv (FRD)	A	K	Y	H	Q	F	S	G	C	I	N	C	G	L	C	Y	A	A	C	P	Q	F	G	L	N	P	E	-	F	I	G	P	A	A	I	T	L	A	Q	R	Y	N	T	D	S	R	D	H
Ec (FRD)	A	K	Y	H	Q	F	S	G	C	I	N	C	G	L	C	Y	A	A	C	P	Q	F	G	L	N	P	E	-	F	I	G	P	A	A	I	T	L	A	H	R	Y	N	E	D	S	R	D	H
<i>Ascaris</i>	E	K	L	D	G	L	Y	E	C	I	L	C	A	C	C	S	T	S	C	P	S	Y	W	W	N	A	D	K	Y	L	G	P	A	V	L	M	Q	A	Y	R	I	I	D	S	R	D	D	
Human	E	K	L	D	G	L	Y	E	C	I	L	C	A	C	C	S	T	S	C	P	S	Y	W	W	N	G	D	K	Y	L	G	P	A	V	L	M	Q	A	Y	R	W	M	I	D	S	R	D	D
Sc	K	L	D	G	L	Y	E	C	I	L	C	A	C	C	S	T	S	C	P	S	Y	W	W	N	Q	E	Q	Y	L	G	P	A	V	L	M	Q	A	Y	R	W	L	I	D	S	R	D	Q	
Ec (SDH)	E	K	L	D	G	L	Y	E	C	I	L	C	A	C	C	S	T	S	C	P	S	F	W	W	N	P	D	K	F	I	G	P	A	G	L	L	A	A	Y	R	F	L	I	D	S	R	D	T

図 3 回虫成虫複合体 II の Ip サブユニットの S-2 結合部位近傍のアミノ酸配列 : Pv は *Proteus vulgaris*, Ec は大腸菌, *Ascaris* は回虫 (成虫), Human はヒト, Sc は酵母。また () 内の FRD はマル酸還元酵素, SDH はコハク酸脱水素酵素。

- 183–186.
- 4) Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (1990) : PCR Protocols. Academic Press, San Diego, 482 pp.
 - 5) Kita, K., Takamiya, S., Furushima, R., Ma, Y. C. and Oya, H. (1988) : Complex II is a major component of the respiratory chain in the muscle mitochondria of *Ascaris suum* with high fumarate reductase activity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89B, 31–34.
 - 6) Kita, K., Takamiya, S., Furushima, R., Ma, Y. C., Suzuki, H., Ozawa, T. and Oya, H. (1988) : Electron-transfer complexes of *Ascaris suum* muscle mitochondria. III. Composition and fumarate reductase activity of complex II. *Biochim. Biophys. Acta*, 935, 130–140.
 - 7) Kita, K., Oya, H., Gennis, R. B., Ackrell, B. A. C. and Kasahara, M. (1990) : Human complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) : cDNA cloning of iron-sulfur (Ip) subunit of liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 166, 101–108.
 - 8) Kita, K., Takamiya, S., Furushima, R., Villagra, E., Wang, H., Aoki, T. and Oya, H. (1991) : Molecular organization of complex II and its role in anaerobiosis. In "Mitochondrial encepharomyopathy" Sato, T. ed., Raven Press, New York, in press.
 - 9) Lombardo, A., Carine, K. and Scheffler, E. (1990) : Cloning and characterization of the iron-sulfur subunit gene of succinate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 265, 10419–10423.
 - 10) 村松正実 (1990) : ラボマニュアル遺伝子工学 増補版, 203頁, 丸善, 東京
 - 11) 大家 裕 (1989) : 寄生虫の代謝—その統一性と多様性. *最新医学の進歩*, 44, 686–694.
 - 12) 大家 裕 (1990) : エネルギー転換系の低酸素圧適応. *順天堂医学*, 35, 443–454.
 - 13) Takamiya, S., Furushima, R. and Oya, H. (1986) : Electron-transfer complex of *Ascaris suum* muscle mitochondria. II. Succinate-coenzyme Q reductase (complex II) associated with substrate reducible cyto-chrome b_{558} . *Biochim. Biophys. Acta*, 848, 99–107.
 - 14) Takamiya, S., Kita, K., Matsuura, K., Furushima, R and Oya, H. (1990) : Oxidation-reduction potentials of cytochromes in *Ascaris* muscle mitochondria : High-redox-potential cytochrome b_{558} in complex II (succinate-ubiquinone reductase). *Biochem. Int.* 21, 1073–1080.
 - 15) Yao, Y., Wakabayashi, H., Matsuda, S., Matsubara, H., Yu, L. and Yu, C. (1986) : Amino acid sequence of the iron-sulfur protein subunit of beef heart succinate dehydrogenase. In "Iron-sulfur protein research" Matsubara, H. *et al.* eds. Japan Sci. Soc. Press. Tokyo, 240–244.