

受理年月日	受理番号
25. 5. 20	2

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 25 年 4 月 28 日

(新規)・継続		※新規か継続か、該当する方を記載	
研究分野	生体防御学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	生体防御分野 教授 玄学南
研究課題名	トキソプラズマの脂肪酸代謝とエネルギー生産系の解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	すずき ゆたか 鈴木 穰	東京大学大学院新領域創成科学研究科・准教授 研究統括	
研究分担者			
研究期間	平成24年4月1日 ~ 平成25年3月31日		
目的・趣旨	トキソプラズマのスポロゾイトからトランスクリプトームを取得し、バイオインフォマティクス解析を行った結果、スポロゾイトでは、植物の発芽で見られるβ酸化と、低酸素状態で代謝を行う回虫(成虫)で見られるNADH-フラマレート還元系を融合したβ酸化→NADH-フラマレート還元系を利用してATP合成を行っている可能性が示唆された。そこで、当該系の存在の有無を阻害剤を用いて実験的に検証することを目的とした。		
研究経過の概要	スポロゾイト脱嚢に伴うエネルギー代謝の概要を明らかにするため、脂肪酸β酸化、NADH-フラマレート還元反応、グリオキシル酸回路、電子伝達系に着目し、それらの阻害剤の添加によるATP合成量の変化を測定した。その結果、スポロゾイトではミトコンドリアATPaseを用いたATP合成が行われていないことが示唆された。また、複合体IIIがATP合成に何らかの形で関与している可能性が予想された。一方で、脂肪酸β酸化、NADH-フラマレート還元反応、グリオキシル酸回路の阻害剤はATP合成に変化を及ぼさなかったことから、スポロゾイトではこれらの経路が利用されていないか、あるいは、トキソプラズマに対してこれらの阻害剤が機能しない可能性が考えられた。当初計画では、NADH-フラマレート還元反応阻害剤であるFlutolanilのマウス経口投与実験を予定していたが、上記実験で活性が無いことが示唆されたため実施を見送った。一方、新たな作業仮説として、acetyl-CoA synthetaseがアセチルCoA→酢酸の反応を触媒する過程でATPが合成される可能性が考えられた。		

受理年月日	受理番号

研究成果の概要	<p>トランスクリプトーム解析から、スポロゾイトでは脂肪酸β酸化が活性化している可能性が示唆されていたが、一方で、電子伝達系が不活性化されていることも同時に示唆されている、そこで、β酸化で産生する大量のNADHとアセチル CoA を、電子伝達系の関与無しに代謝し ATP を得ることが出来るか否かを検討することが本研究の主要課題である。そのため、阻害剤を用いた生化学的実験により、スポロゾイトにおける脂肪酸β酸化と電子伝達系の関与と、電子伝達系をバイパスして ATP を合成しうる可能性がある NADH-フマレート還元反応、グリオキシル酸回路の関与を併せて検討した。</p> <p>【脂肪酸β酸化】阻害剤として、トリメタジジン、および、Ranolazine を用いた。両化合物ともトキソプラズマにおける活性は不明なため、予備実験としてタキゾイトを用いて活性の有無を検討した。HFF 細胞へトキソプラズマを感染させ 48 時間後に阻害剤を添加し、その 24 時間後にタキゾイトを精製し虫体に含まれる ATP を測定したが、HFF 細胞に影響の出ない最大濃度 (100 μM) でもタキゾイト含有 ATP に変化は認められず、両化合物のトキソプラズマにおける阻害活性の有無を明らかにすることは出来なかった。一方、同一濃度の阻害剤を脱囊後のスポロゾイトへ作用させ、含有 ATP 量を継時的に測定したが、コントロール区との差異を認めることはできなかった。従って、スポロゾイトでβ酸化は利用されていないのか、利用されているにも関わらず両化合物が阻害活性を示さなかったのかは、現状では明らかではない。</p> <p>【NADH-フマレート還元反応・グリオキシル酸回路】阻害剤として、Flutolanil およびイタコン酸を用い、同様に、それぞれ 100 μM、1000 μM をスポロゾイトへ添加したが含有 ATP に違いは認められなかった。従って、当該経路が利用されていないのか、阻害剤作用が無いのかは、現状では明らかではない。</p> <p>【電子伝達系】ATPase 阻害剤である Oligomycin と、複合体Ⅲの阻害剤である Antimycin A1 を用いた。Oligomycin は 0.5 μg/mL でタキゾイトに対して ATP 合成阻害を示したが、スポロゾイトに対しては、それより濃い 50 μg/mL でも阻害を示さなかった。これは、スポロゾイトでは ATPase を介した ATP 合成が行われていない可能性を示唆している。一方、Antimycin A1 を用いた際には含有 ATP 量の低下が認められた。従って、スポロゾイトでは複合体Ⅲが関与する ATP 合成系が機能している可能性がある。</p> <p>以上の検討により、当初想定していた NADH-フマレート還元反応やグリオキシル酸回路の関与を積極的に示す結果は得られなかったため、β酸化によって産生するアセチル CoA から直接 ATP を合成する acetyl-CoA synthetase (TGME49_066640、EC 2.8.3.8) に注目した。この酵素はスポロゾイトでも転写産物が認められており、また、ヒトにホモログは無い。代謝産物である酢酸の濃度変化を計測することで、この酵素の関与が推定可能と考えられる。</p> <p>当初の研究計画にはなかったが、脱囊スポロゾイト虫体を精製することなしに、oocyst 構成成分と共に ATP 含有量を計測した結果、非常に高い値が得られた。これは、oocyst 内に大量の ATP が貯蔵されている可能性を示唆している。また、脱囊後 18 時間のスポロゾイトからは、僅かな ATP しか検出することが出来なかった。これは、スポロゾイトには継続して ATP 合成を行う能力がない可能性を示唆している。</p>
研究成果の発表	予備調査としては十分な知見が得られたが、明確な結論が得られたわけではないので、成果発表は見送った。

受理年月日	受理番号

【追加図表】

表 1 HFF 細胞における各化合物の影響

	Flutolanil	トリメタジジン	Ranolazine	イタコン酸	Antimycin A1	Oligomycin
希釈 (10 倍)	100 uM	100 uM	100 uM	1000 uM	100 ug/mL	100 ug/mL
0	13113883	18015752	17396714	17315590	11566318	123261
-1	18082096	20274458	21061726	20083084	20035960	14559778
-2	18974028	20886746	20202048	20108728	17911830	20596652
-8	14295647	18015752	20010664	18646690	18522500	15356449

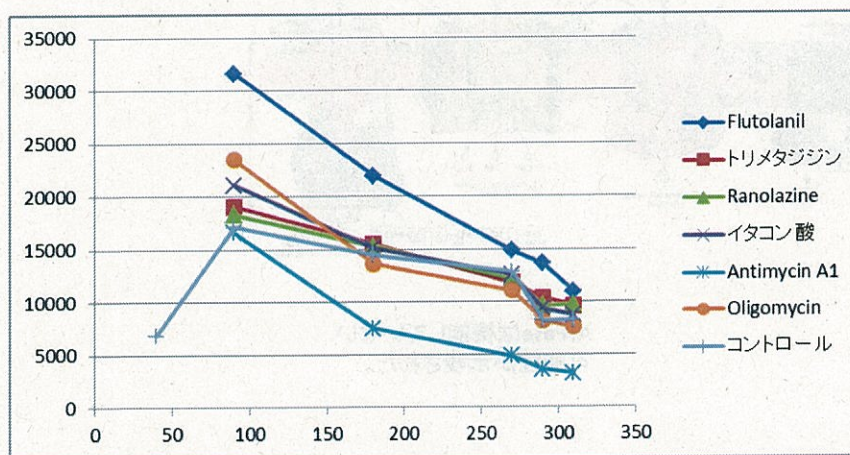
96well プレートで HFF 細胞を培養し、各化合物を添加して 24 時間後の含有 ATP を "Cellno" ATP ASSAY reagent を用いてシフェラーゼによる発光強度から測定した。

表 2 タキゾイトにおける各化合物の影響

	Flutolanil	トリメタジジン	Ranolazine	イタコン酸	Antimycin A1	Oligomycin
希釈 (10 倍)	100 uM	100 uM	100 uM	1000 uM	100 ug/mL	50 ug/mL
0	58776	53407	81529	26608	6215	2010
-1	78623	52262	95182	36779	7739	12365
-2	58088	48376	59267	31865	8073	10514

6cm dish で培養した HFF 細胞に moi1.5 で ME49 株を感染させた。感染後 48 時間から各化合物を添加し、感染後 72 時間で虫体を回収、5 um のフィルターで精製を行った後、120 ul の PBS へ懸濁した。このうち 50 ul を分取し、そこへ "Cellno" ATP ASSAY reagent を 50 ul 加え混合後、80 ul を分取し、10 秒間、ルミノメーターで測定した。

図 1 スポロゾイトにおける各化合物の影響



スポロゾイト脱囊処理後、Flutolanil、トリメタジジン、Ranolazine、イタコン酸、Antimycin A1、Oligomycin をそれぞれ、100 uM、100 uM、100 uM、1000 uM、100 ug/mL、50 ug/mL 添加し、含有 ATP 量を継時的に測定した。横軸は脱囊後時間 (分)。縦軸は発光量 (arbitrary units)。

受理年月日	受理番号

図2 スポロゾイトの推定代謝経路

