

薬剂標的としての
ブタ回虫ミトコンドリア呼吸鎖の生化学的解析

大 森 惇 子

学位論文

薬剤標的としての
ブタ回虫ミトコンドリア呼吸鎖の生化学的解析

東京大学大学院医学系研究科
国際保健学専攻
指導教員：北 潔 教授

大 森 惇 子

2012 年度

目次

略号	1-3
要旨	4
第1章 序文	5-20
1.1 寄生と低酸素適応	5-6
1.2 回虫の宿主体内移行におけるエネルギー代謝変動	6-7
1.3 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II	7-9
1.4 キノン種	9
1.5 薬剤標的としての NADH-フマル酸還元系	9-10
1.6 本研究の背景および目的	10-11
図表	12-20
第2章 材料と方法	21-38
2.1 各ステージのブタ回虫	21-23
2.2 ミトコンドリア調製	23-24
2.3 酵素活性測定	25-26
2.4 キノン構成解析	27
2.5 サブユニット組成解析	28-30
2.6 定量 RT-PCR	30-32
2.7 阻害剤の検討	32-33
図表	34-38

第3章 LL3 およびヤングアダルトにおけるミトコンドリア呼吸鎖の 生化学的解析	39-52
3.1 序論	39-40
3.2 結果	40-42
3.3 考察	43-46
図表	47-53
第4章 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II を標的とした阻害剤の検討	54-77
4.1 序論	54-55
4.2 結果と考察	55-60
4.3 まとめ	60-61
図表	62-73
第5章 まとめと展望	74-78
参考文献	79-85
謝辞	86-87

略号

A. suum : *Ascaris suum*

ATP : adenosine 5'-triphosphate

BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate

CybL : cytochrome *b* large subunit

CybS : cytochrome *b* small subunit

CybS^A : adult type CybS

CybS^L : larve type CybS

DCIP : 2,6-dichloroindophenol

DDM : *n*-dodecyl- β -D-maltoside

DMSO : dimethyl sulfoxide

DOC : sodium deoxycholate

FAD : flavin adenine dinucleotide

Fp : flavoprotein subunit

Fp^A : adult type Fp

Fp^L : larve type Fp

FRD : fumarate reductase

HPLC : high performance liquid chromatography

hrCNE : high resolution clear native electrophoresis

IC₅₀ : 50% inhibitory concentration

Ip : iron-sulfur cluster protein subunit

L3 : third stage larva

LL3 : lung stage L3

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2,4-tetrazolium bromide

MV : methyl viologen

NADH : nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form

NADH-FR : NADH-fumarate reductase

NativePAGE : native polyacrylamide gel electrophoresis

NBT : Nitro-Blue tetrazolium chloride

PEP : phosphoenolpyruvate

PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase

PK : pyruvate kinase

PMS : phenazine methosulfate

QFR : quinol-fumarate reductase

RO : reverse osmosis

RQ : rhodoquinone

dRQ : decyl rhodoquinone

SDH : succinate dehydrogenase

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS polyacrylamide gel electrophoresis

SI : selective intensity

SML : sucrose monolaurate

SQR : succinate-ubiquinone reductase

TCA : tricarboxylic acid

UQ : ubiquinone

要旨

ブタ回虫は生活環において、エネルギー代謝系を好氣的から嫌氣的に轉換し環境の変化に適応している。嫌氣的代謝系における NADH-フマル酸還元系は宿主哺乳類には存在しないミトコンドリア呼吸鎖であり、格好の薬剤標的と考えられている。また、ミトコンドリア呼吸鎖の変動のステージ毎における詳細な情報は、現在、様々な分野で注目されている低酸素適応機構を理解する上でも重要である。本研究では環境の酸素分圧が劇的に変化する LL3、ヤングアダルト (YA)、成虫のミトコンドリア呼吸鎖の生化学的解析を行なった。YA は、成虫と生息域、形態は同様であるがミトコンドリア呼吸鎖の変動は完了していないことが明らかになった。さらに、ブタ回虫複合体 II の特異的な阻害剤として、Flutolanil 誘導体の構造活性相関解析を行ない、選択性が 20,000 倍まで向上した化合物を得ることができた。

第1章

序文

1.1 寄生と低酸素適応

生物は外部環境の変化に適応しながら生活を営んでいる。寄生生物の多くは、その生活環において外部環境の変動に適応するため、それぞれに種特異的な機構を発達させてきた。このような寄生現象は、生物間相互作用の観点から極めて興味深い研究対象であり、また宿主とは異なる分子がこの現象に関与している可能性があるため、医学的な観点からその現象の解明が新たな創薬の標的をもたらすことが期待される。

私の所属するグループは寄生現象の重要な一側面として、低酸素適応に焦点を絞って研究を進めてきた。多細胞真核生物の低酸素適応機構は原核生物とは異なっていることが明らかになりつつあり、また薬剤標的となりうることから臨床的にも重要である。さらに最近、低栄養、低酸素環境下で増殖する癌細胞についても、その治療への応用も含め注目されている。寄生性線虫であるブタ回虫 (*Ascaris suum*) (図 1-1) は以前からその大きさと扱いやすさから、寄生虫のエネルギー代謝系のモデル生物としてよく研究されている。その成虫は、外界と比較すると低酸素環境にある小腸に寄生し、宿主である哺乳類とは大きく異なった嫌氣的エネルギー代謝系を保持しており、この代謝系はこれまでに詳細な解析がなされている [1-6]。

好気性生物のミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系では、代謝基質からの還元当量を酸素に伝達する過程でマトリックス側から膜間腔側にプロトン (H^+) を輸送

し、形成させた H^+ の電気化学的ポテンシャルを用いて ATP 合成酵素により ATP を合成する。多くの生物種においてミトコンドリア電子伝達系の最終電子受容体は酸素であるため、環境の酸素分圧変化は生体内のエネルギー産生に大きな影響を与えると考えられる。このような点からも、ミトコンドリアの低酸素適応についての研究はエネルギー代謝の恒常性維持のための生理的役割や遺伝子発現機構、酵素の進化を理解する上で大きな意義を持っている。

1.2 回虫の宿主体内移行におけるエネルギー代謝変動

ブタ回虫は環境の酸素分圧変化に適応するためミトコンドリアのエネルギー代謝系を大きく変動させている。ブタ回虫は、自由生活性の受精卵から第 1 期幼虫 (L1)、第 2 期幼虫 (L2) を経て感染幼虫包蔵卵中の第 3 期幼虫 (L3) となるまで外界の通常酸素分圧下 (pO_2 : 20%) に棲息している。感染幼虫包蔵卵中の L3 は経口感染して小腸で孵化した後、肝臓、心臓、肺と宿主体内を移行し、再び小腸に戻り成虫へと成長する [7] (図 1-2)。自由生活性の幼虫は哺乳類と同様に好氣的エネルギー代謝を作動させている。解糖系で生成された PEP (phosphoenolpyruvate: ホスホエノールピルビン酸) は PK (pyruvate kinase: ピルビン酸キナーゼ) によってピルビン酸 (pyruvate) となり、アセチル CoA (acetyl CoA) を経て、TCA 回路で CO_2 と H_2O に分解され、ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系は酸化的リン酸化を用いた好氣的代謝経路により、ATP 産生を行なっている [8] (図 1-3)。幼虫のミトコンドリア呼吸鎖は哺乳類と同様で複合体 I (NADH-ユビキノン酸化還元酵素)、複合体 II (コハク酸-ユビキノン還元酵素)、複合体 III (ユビキノール-シトクロム c 酸化還元酵

素)、複合体 IV (シトクロム *c* 酸化酵素)と UQ (ubiquinone: ユビキノン) から構成されている (図 1-4)。

一方、成虫は小腸内の低酸素環境下 (pO_2 : 2.5%-5.0%) に棲息しており、NADH-fumarate reductase 系 (NADH-FR system: NADH-フマル酸還元系) を最終ステップとして、酸素を利用しない PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase: ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ) -コハク酸経路 (succinate pathway) を作動させている。PEP は PEPCK によってオキサロ酢酸 (oxaloacetate) となり、リンゴ酸 (malate) を経てミトコンドリア内に輸送された後、ピルビン酸とフマル酸 (fumarate) が生じる。リンゴ酸からピルビン酸が生成するときに生じる NADH の還元当量は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II の QFR (quinol-fumarate reductase: キノール-フマル酸還元酵素) 活性によりフマル酸のコハク酸への還元に使われる。この反応は複合体 I の site I 経由の ATP 合成と共役しており、回虫を低酸素環境下でも ATP 産生を可能にしている [3,9] (図 1-3)。この NADH-フマル酸還元系は複合体 I (NADH-ロドキノン酸化還元酵素)、複合体 II (QFR)と低電位のロドキノン (rhodoquinone: RQ) から構成され、複合体 II は末端酸化酵素として重要な役割を担っている (図 1-4)。

1.3 ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II はミトコンドリア内膜に局在し、4 つのペプチドにより構成されている [10] (図 1-5)。マトリックス側に突出した親水性の触媒部位は、FAD (flavin adenine dinucleotide) を含むフラボタンパク質 (Fp) サブユニッ

ト (分子量約 70 kDa) と 3 種の異なる鉄-硫黄クラスター (Fe-S) を持つ鉄-硫黄タンパク質 (Ip) サブユニット (分子量約 30 kDa) から構成される。この触媒部位は、好気代謝経路では SDH (succinate dehydrogenase: コハク酸脱水素酵素) としてコハク酸からの電子受容体へ、嫌氣的代謝経路では FRD (fumarate reductase: フマル酸還元酵素) として電子供与体からフマル酸への電子伝達を担っている (図 1-6)。残り 2 つのペプチドは、シトクロム *b* 大サブユニット (CybL) (分子量約 15 kDa) とシトクロム *b* 小サブユニット (CybS) (分子量約 13 kDa) と呼ばれ、疎水性の膜アンカーとしての役割を果たす。これらは補欠分子族であるヘム *b* を持ち、Ip と共に疎水性膜内電子伝達体のキノンと電子の授受を行なう部位を形成している。

ブタ回虫ミトコンドリアの複合体 II は、好氣的呼吸鎖では SQR (succinate-ubiquinone reductase: コハク酸-ユビキノン還元酵素) として機能するのに対し、嫌氣的呼吸鎖では SQR とは逆反応の QFR (quinol-fumarate reductase: キノール-フマル酸還元酵素) として機能している (図 1-6)。また、回虫複合体 II はステージ特異的なアイソフォームとして発現していることが報告されている (図 1-7) [2,5,11-13]。Ip サブユニットと CybL サブユニットはステージ間で共通だが、Fp サブユニット (幼虫型 Fp, Fp^L; 成虫型 Fp, Fp^A) と CybS サブユニット (幼虫型 CybS, CybS^L; 成虫型 CybS, CybS^A) にはそれぞれ 2 種類のアイソフォームが存在する。成虫では Fp^A、CybS^A を持つ成虫型複合体 II、L3 では Fp^L、CybS^L を持つ幼虫型複合体 II が発現しており [5]、肺ステージ L3 (LL3) では Fp^L、CybS^A を持つ混合型複合体 II がもっとも多く存在する組み合わせだと考えられている [13]。複合体 II の変動はある時期を境に一斉にサブユニット組成が変換するのではなく、アンカーである CybS サブユニットから先に起こり、続いて Fp サブユニットで起こることが明らかにされて

いる [11,14]。回虫成虫の複合体 II は結晶構造が解析され、補欠分子族、RQ の結合様式が明らかにされた [15] (図 1-5)。

1.4 キノン種

前述したように、ミトコンドリア呼吸鎖では複合体間の電子の授受は疎水性膜内電子伝達体であるキノンが行なっている。回虫の場合、好氣的代謝を営んでいる L3 は哺乳類と同様にベンゾキノン型の UQ を用いており、酸化還元電位は $E_m' = +110$ mV である (図 1-8A)。一方、嫌氣的代謝を営んでいる成虫は UQ と同様にベンゾキノン型ではあるが側鎖のメトキシ基 (-OCH₃) がアミノ基 (-NH₃) に置換した、低電位の RQ ($E_m' = -63$ mV) を用いている (図 1-8B)。フマル酸の酸化還元電位が $E_m' = +30$ mV であることから、RQ の電位の低さが NADH からフマル酸への電子の伝達を可能にしている。

これまでの各ステージにおけるキノン構成の解析により、L3 のミトコンドリアの RQ/UQ 比は 75/25 [16]、実験宿主であるウサギから回収された肺ステージ L3 (LL3) のミトコンドリアの RQ/UQ 比は 70/30 [11]、成虫のミトコンドリアの RQ/UQ 比は 100/0 [16] であることがわかっている。

1.5 薬剤標的としての NADH-フマル酸還元系

この様に寄生性線虫の持つ NADH-フマル酸還元系は宿主である哺乳類のミトコンドリアには存在しないため、格好の薬剤標的になると考えられている (図

1-9A)。私の所属するグループではこれまでに、抗寄生蠕虫薬の開発を目標として、ブタ回虫をモデルとして使用した阻害剤の検討を行なってきた。実際に複合体 I の阻害剤として、nafuredin [9]、quinazoline 系化合物 [17] が報告されている。Nafuredin はヒツジの胃に寄生し、家畜の生産性の面でも問題となっている *Haemonchus contortus* に動物実験でも効果を示し [9]、quinazoline 系化合物はキツネを終宿主とし、ヒトに感染すると重篤な症状を示す *Echinococcus multilocularis* に *in vitro* で効果を示し [17]、NADH-フマル酸還元系が優れた薬剤標的であることが示された。一方、複合体 II に関して、回虫ミトコンドリアに対して高い阻害活性を示す atpenin A5 を見出したが、哺乳類ミトコンドリアにも高い阻害活性を示し、選択性が得られなかった [18]。さらなるスクリーニングの結果、日本農薬株式会社のモンカットと呼ばれる植物抗カビ剤で担子菌類のミトコンドリア呼吸鎖複合体 II を阻害する Flutolanil が約 800 倍の選択性を示すことが明らかにされた (図 1-9B) [19]。

1.6 本研究の背景および目的

この様に、これまで L3、LL3、成虫ミトコンドリア複合体 II について酵素学的解析、サブユニット組成の解析が行なわれ、複合体 II の体内移行期における変換のタイミング、代謝系変動への関与が明らかにされつつある。しかし、LL3 は体内移行の途中で成虫に成長するまで、少なくとも 1 回の脱皮、寄生部位の変化など生活環における多くの段階が残っている。また LL3 のエネルギー代謝系は好氣的から嫌氣的環境への適応期であり、エネルギー代謝系の転換は完了していない。この好氣的-嫌氣的エネルギー代謝系の転換を理解するためには、LL3 から成虫と

なるまでのエネルギー代謝の変化を明らかにする必要がある。さらに、各ステージにおけるミトコンドリア呼吸鎖、複合体 II の詳細な情報は、基礎生命科学に基づく抗寄生性線虫薬の開発を考えたとき、薬剤が効果を示すステージに関する重要な知見を得ることができる点で必須と考えられる。

そこで、本研究では環境の酸素分圧が大きくに変化する肺 (pO_2 : 13.2%) に棲息する LL3、小腸 (pO_2 : 2.5-5.0%) に到達してサイズが大きく変化し、成虫に成長する前の段階の感染 38 日後のヤングアダルト (YA) と嫌氣的エネルギー代謝系への転換が最終的に完了している成虫を用いてミトコンドリア呼吸鎖の酵素学的解析および複合体 II のサブユニット組成の解析を行なった。

NADH-フマル酸還元系を標的とした阻害剤の検討で、複合体 I に関して nafuredin、quinazoline 系阻害剤を見出したが、どちらも高い選択性の化合物が得られず、薬剤に至っていない。しかし、動物実験等 [9,17] により NADH-フマル酸還元系が良い薬剤標的となりうると示されたことから、本研究ではさらに複合体 II に関して検討した。回虫複合体 II は哺乳類の複合体 II とは異なる機能を有しているため効果的な薬剤標的として期待され、実際に紋枯病の薬剤として知られている Flutolanil が高い選択性を持って回虫複合体 II を阻害することが明らかにされている (図 1-9) [19]。そこでさらなる選択性の向上を目指し、阻害剤の構造と活性相関についての知見を得るため、本研究では Flutolanil をリード化合物として合成した誘導体、構造の類似した市販化合物、また日本農薬株式会社所有の化合物について、回虫ミトコンドリアと宿主哺乳類のブタミトコンドリアに対する阻害活性を調べた。

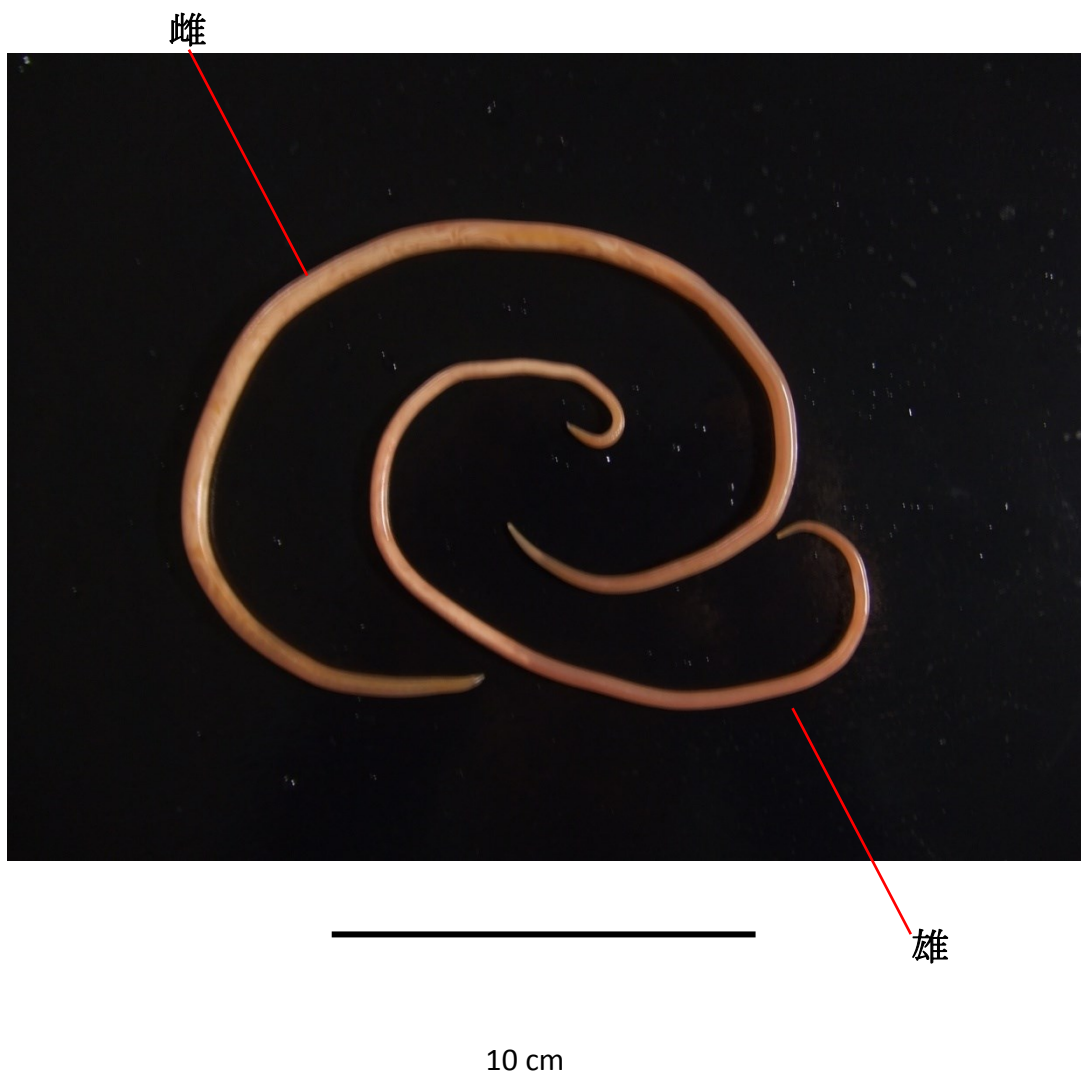


図 1-1 ブタ回虫 (*Ascaris suum*)

成虫の体長は雌が約 20-30 cm、雄が約 10-15 cm で生存状態では淡紅乳白色である。

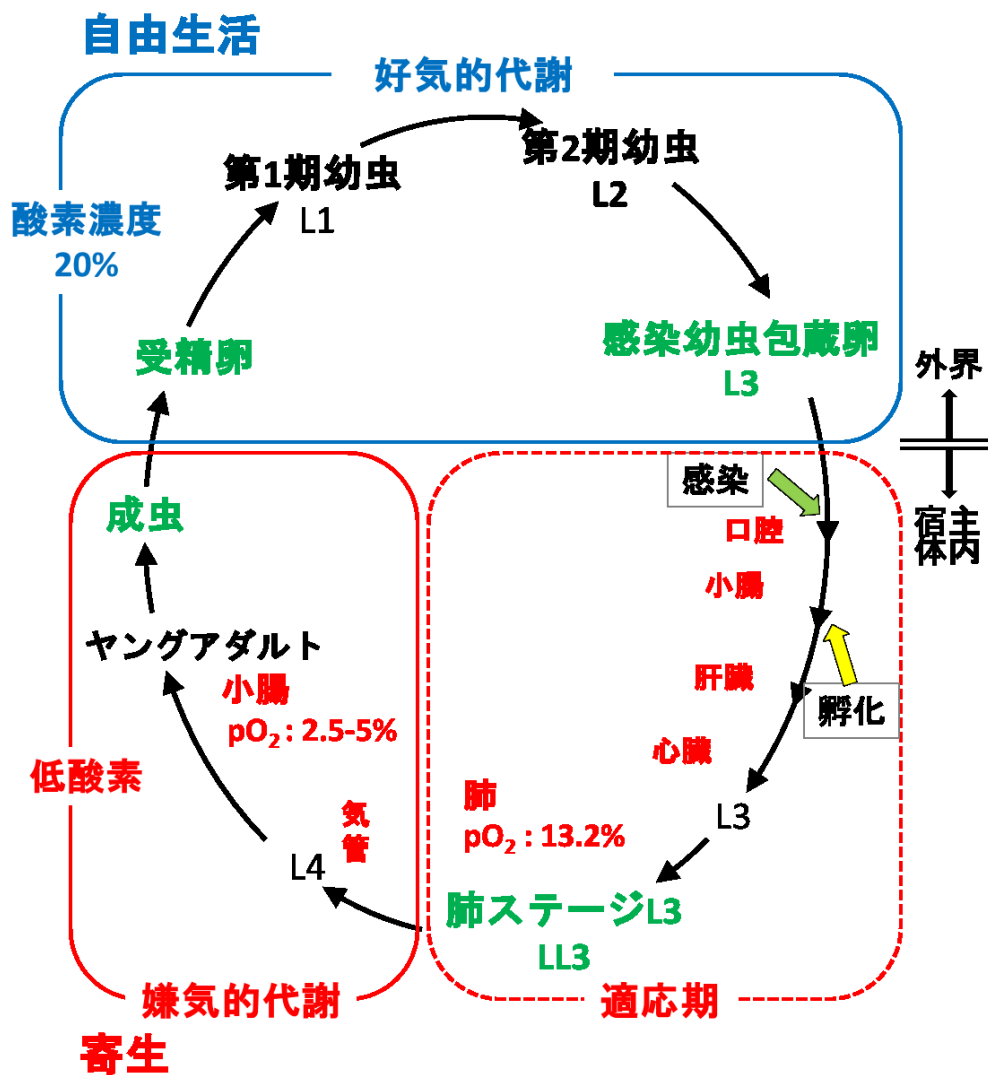


図 1-2 ブタ回虫の生活環

ブタの糞便中に排出された受精卵は、外界で2度の脱皮を経て感染幼虫包蔵卵 (L3) となる。経口感染により宿主体内に侵入し小腸で孵化した後は、肝臓、心臓、肺と体内を移行し、最終的に低酸素環境下である小腸で成虫へと成長する。

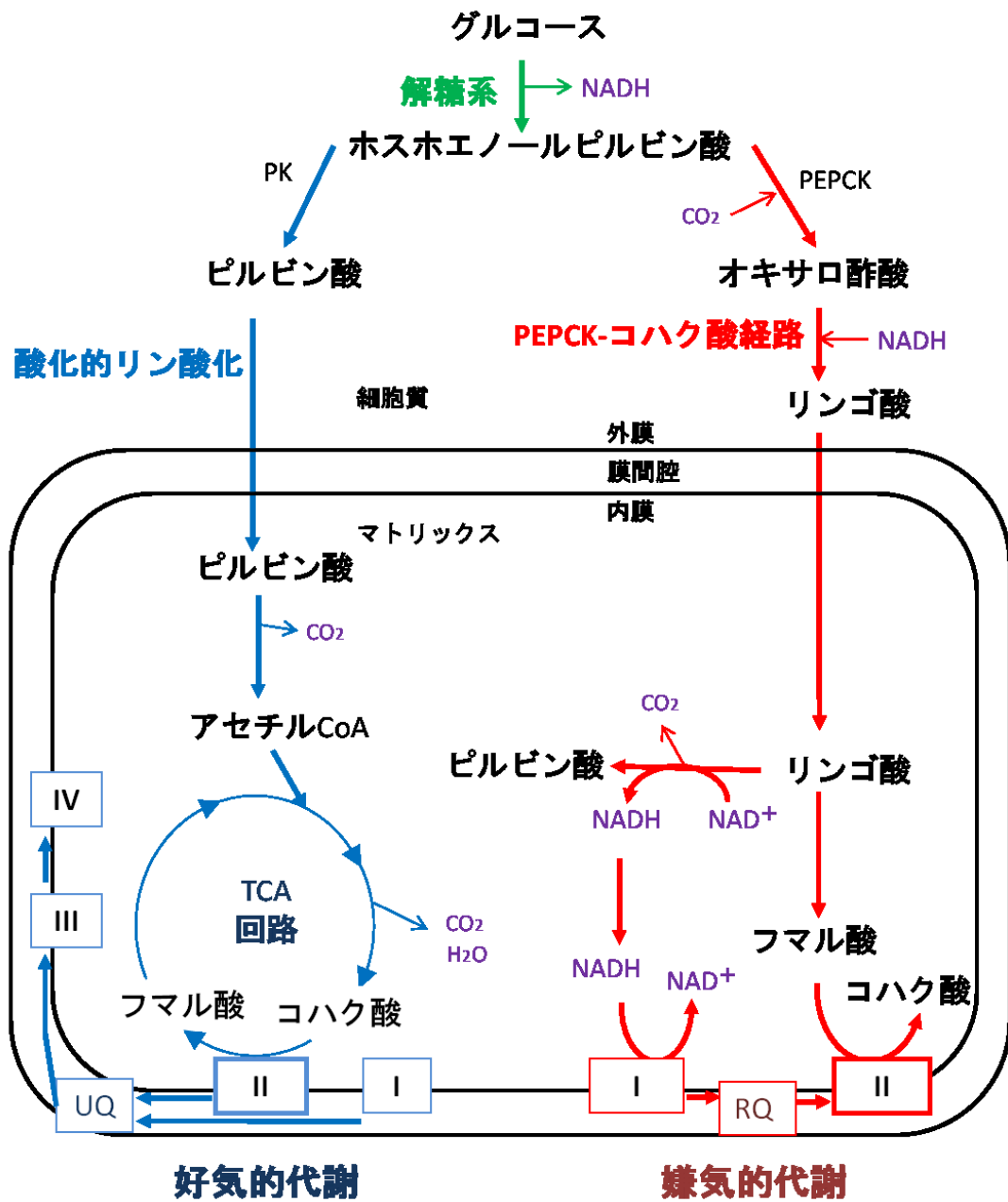
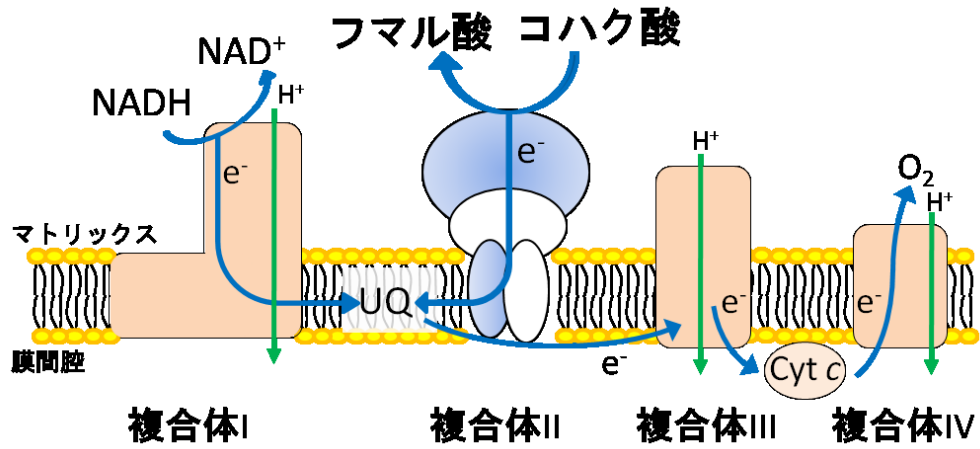


図 1-3 宿主および回虫の好氣的/嫌氣的エネルギー代謝

宿主である哺乳類と回虫幼虫は、酸化リン酸化を用いた好氣的代謝経路が働く。小腸に棲息する成虫は酸素を利用しない PEPCK-コハク酸経路が機能する。

-好氣的代謝-



-嫌氣的代謝-

NADH-フマル酸還元系

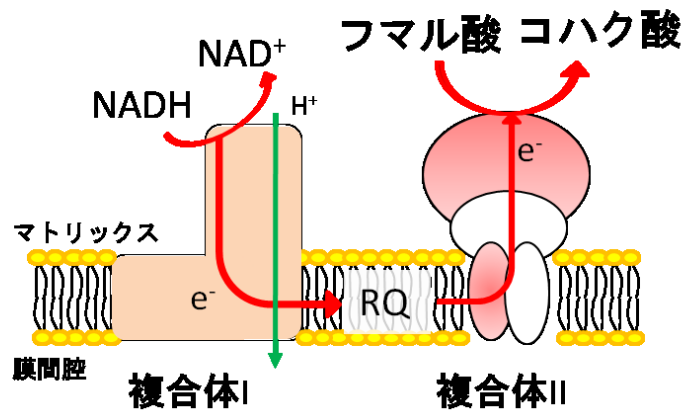
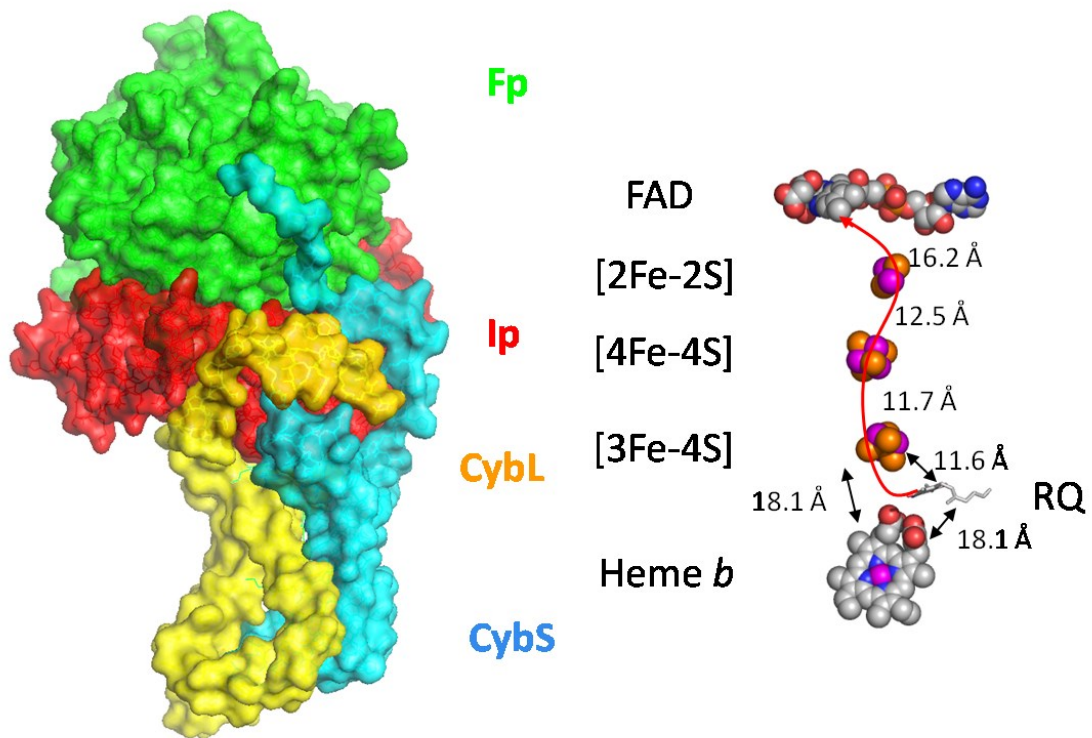


図 1-4 好氣的/嫌氣的ミトコンドリア電子伝達系

好氣的呼吸鎖電子伝達系は、複合体 I, II, III, IV、UQ、Cyt c から構成される。嫌氣的ミトコンドリア電子伝達系 (NADH-フマル酸還元系) は、複合体 I, II、RQ から構成され、PEPCK-コハク酸経路における最終電子伝達反応を行う。



4サブユニット

補欠分子族: FAD, 3つの[Fe-S]clusters, ヘム *b*

120 kDa

(Shimizu *et al. J. Biochem* 2012)

図 1-5 ミトコンドリア複合体 II

複合体 II は、マトリックス側に突出した親水性の触媒部位として機能する Fp、Ip サブユニットと、膜にアンカーとして局在、Ip と共に膜内のキノンと電子の授受を行う部位を形成する CybS、CybL サブユニットの 4 つのペプチドから構成される [10,11]。

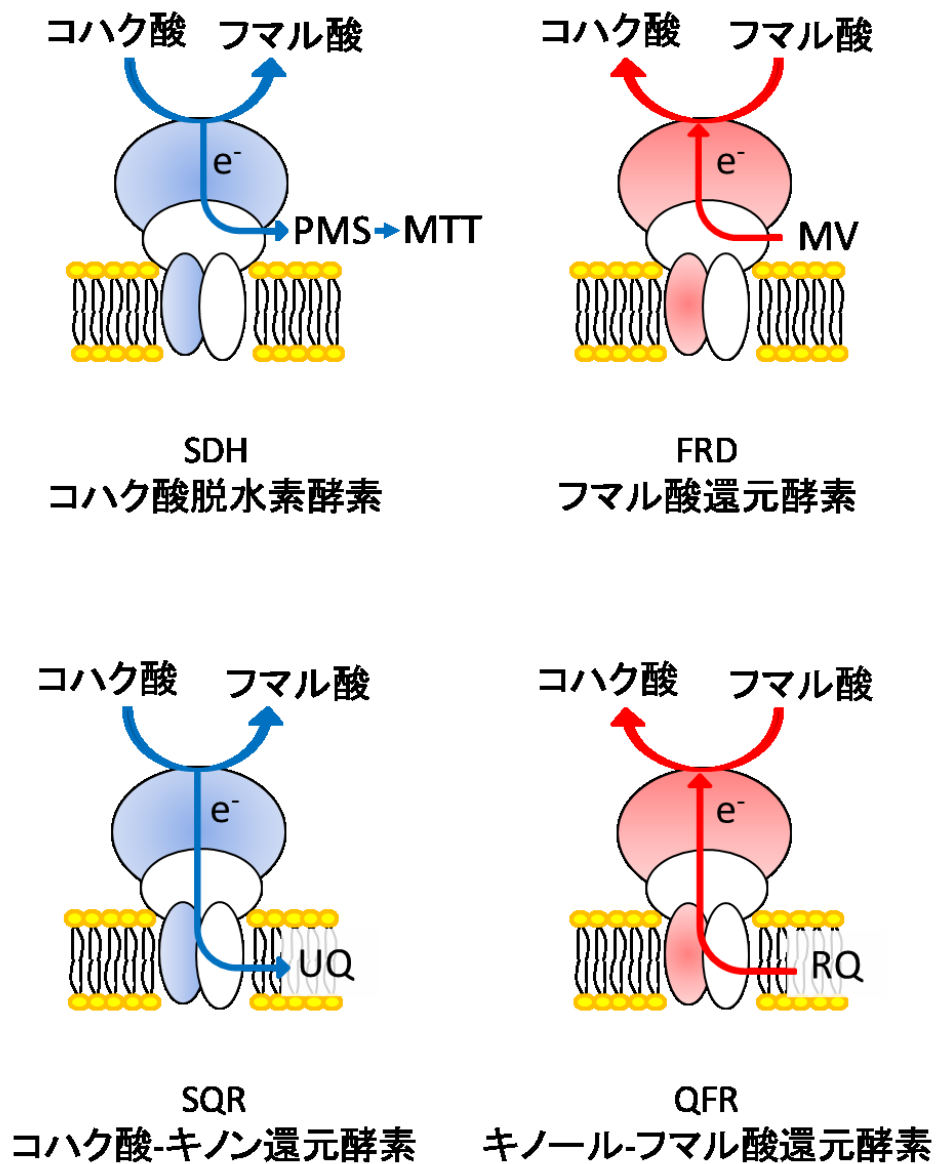


図 1-6 SDH、SQR と FRD、QFR

SDH、FRD は複合体 II の親水性触媒部位(Fp, Ip)の活性であり、SDH はコハク酸脱水素酵素として機能し、FRD はその逆反応であるフマル酸還元を触媒する。複合体 II のサブユニット全体としては、好氣的電子伝達においては SQR として、嫌氣的電子伝達系である NADH-フマル酸還元系では QFR として機能する。

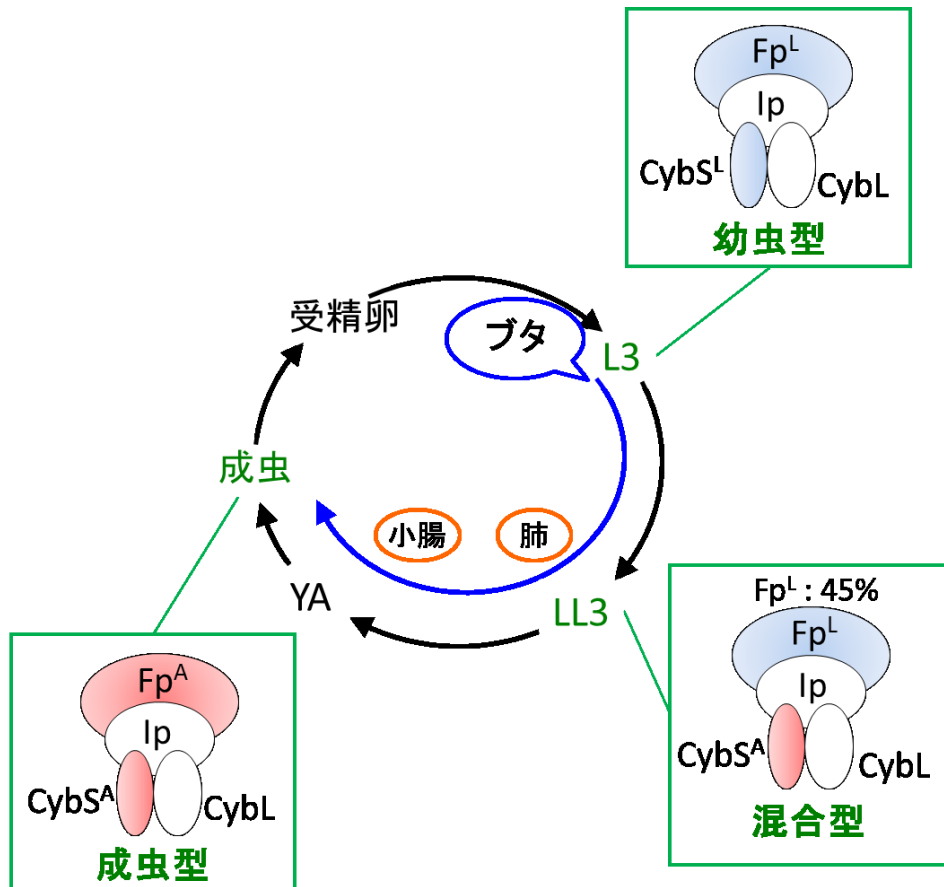
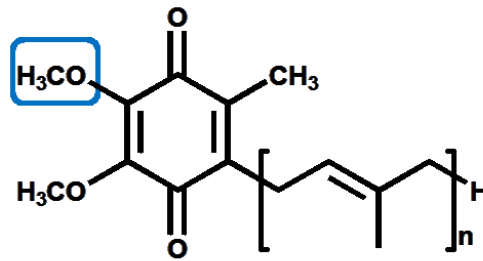


図 1-7 複合体 II のアイソフォーム

回虫複合体 II はステージ特異的なアイソフォームを発現している。Ip、CybL はステージ間で共通だが、Fp、CybS はそれぞれ成虫型 (Fp^A、CybS^A)、幼虫型 (Fp^L、CybS^L) 2 種類のアイソフォームが存在する。幼虫は幼虫型 (Fp^L、CybS^L)、成虫は成虫型 (Fp^A、CybS^A) 複合体 II が発現し、LL3 では混合型 (Fp^L、CybS^A) が最も多く存在する組み合わせであると考えられている [2,5,11-13]。

A UQ: ユビキノン

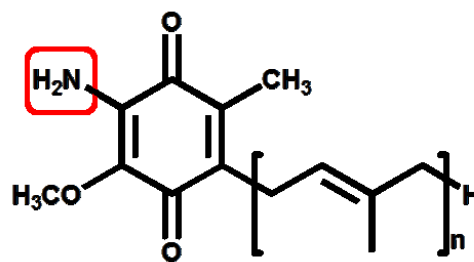
$E_{m'} = +110 \text{ mV}$



好氣的代謝系

B RQ: ロドキノン

$E_{m'} = -63 \text{ mV}$



嫌氣的代謝系

図 1-8 キノン種

好氣的代謝系で用いられる A) ユビキノン (UQ) の構造と嫌氣的代謝系で用いられる B) ロドキノン (RQ) の構造。

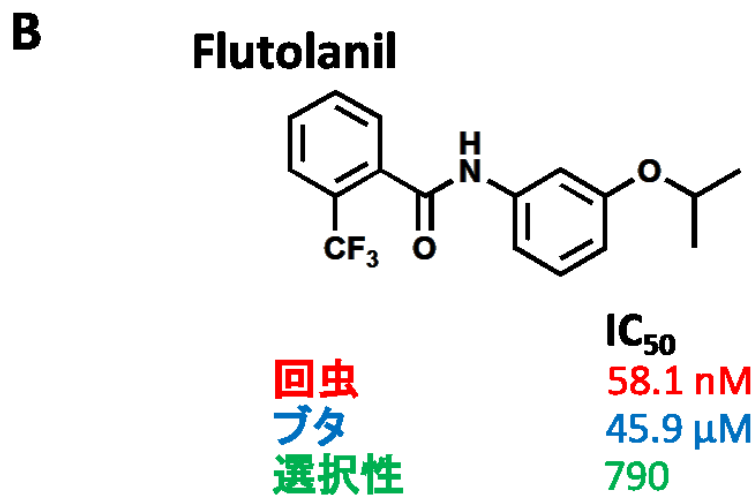
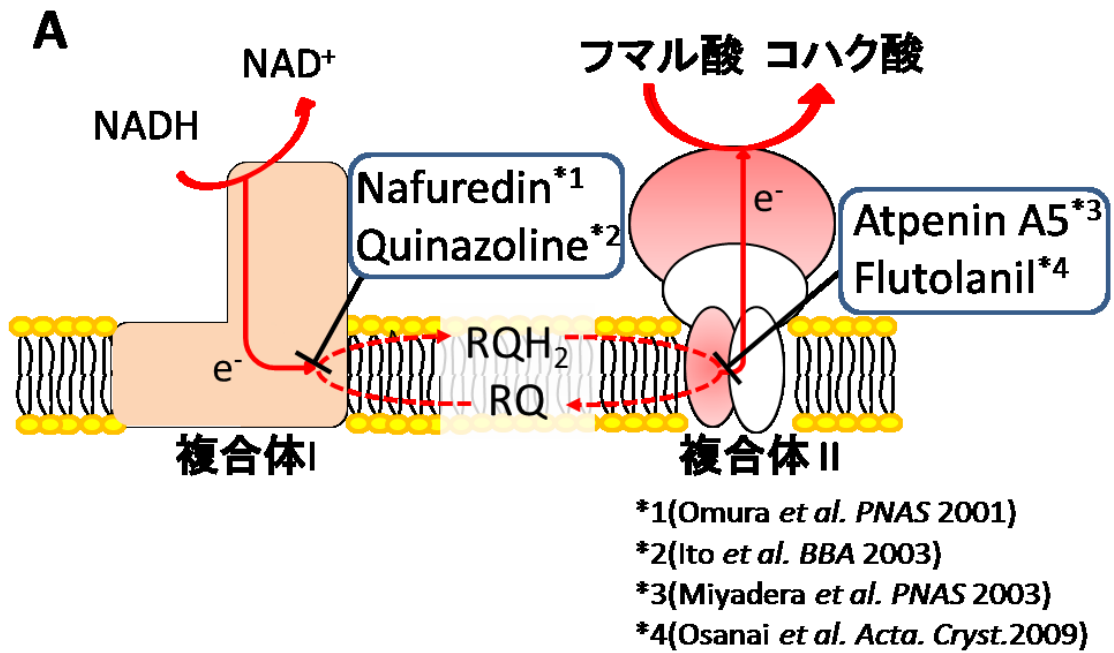


図 1-9 NADH-フマル酸還元系の阻害剤と Flutolanil

A) NADH-フマル酸還元系は哺乳類のミトコンドリアには存在しない呼吸鎖で格好の薬剤標的と考えられる。

B) イネ紋枯病菌などの担子菌類に特異的な殺菌剤である Flutolanil の構造。回虫に対する IC₅₀ が 58.1 nM、ブタに対する IC₅₀ が 45.9 μM であり、選択性 (IC₅₀ 回虫 / IC₅₀ ブタ) は 790 倍である。

第 2 章

材料と方法

2.1 各ステージのブタ回虫 (*Ascaris suum*)

2.1.1 成虫

成虫は東京中央食肉卸売市場より入手し、本研究ではサイズの大きいメスのみを使用した。リンガー液 (145 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 7.2 mM CaCl₂, 1.2 mM NaHCO₃) 中で半日から 2 日保存し、実験室に搬入後、眼科用ハサミで解剖し筋肉と内臓を分け、筋肉のみを MSE バッファー (210 mM mannitol, 10 mM sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.4) で洗浄後、ミトコンドリアを調製するまで-80°C に保存した。

2.1.2 受精卵

メスのブタ回虫の子宮を陰門側から 5-10 cm 回収し、0.5 N NaOH 中で約 1 ヶ月間 4°C にて保存し、子宮壁等を除去した。0.5 N NaOH 中の子宮を 50 ml ポッター型ガラス・テフロンホモジナイザーで破碎した後、720×g、1 分間遠心し、子宮組織を除去した。受精卵を含んだ沈殿は上清が中性になるまで RO (reverse osmosis) 水で洗浄した。この沈殿に RO 水と等量の *n*-butyl alcohol を加えて懸濁し、720×g、1 分間遠心し、タンパク質膜を除去した。その後、沈殿を RO 水で数回洗浄し、得られた沈殿を受精卵とした。

2.1.3 感染幼虫包蔵卵 (L3)

上記で得られた受精卵を新庄博士により開発されたスポンジによる培養法 [20] で虫卵を培養し、L3 とした。25 ml の細胞培養用 T 型フラスコ (FALCON) に細断したスポンジを詰め、0.1 N NH_2SO_4 に懸濁した受精卵を 10 ml 加え、30°C で培養した。

2.1.4 肺ステージ L3 (LL3)

ブタ (LMS 種、雌、生後 6 ヶ月) に感染幼虫包蔵卵を 1 頭当たり約 15×10^5 個経口摂取させた。感染 7 日目のブタの肺を摘出し、LL3 を回収した ([11]より改変)。

摘出した肺を PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4) で洗浄して気管を取り除き、ガラスプレート上で 3 cm 角にハサミで切断した。肺の組織を新しいガラスプレート上にてハサミで切り刻み、2 重にしたガーゼで包んだ。これを 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin を加えた PBS (PBS (P/S)) で満たし 1 L ビーカーに入れて 37°C のインキュベーター中にて 15 時間静置し、LL3 を肺組織片より遊出させた。その後、組織片を包んだガーゼを 1 L ビーカーより取り出し、LL3 を含んだ PBS (P/S) を 100 ml のガラス製遠心管に移して 37°C のインキュベーター中に 1 時間静置した。アスピレーターで上清を除き、PBS (P/S) で洗浄した後、水を加え 37°C のウォーターバス中にて 30 分間静置し溶血させた。さらにその上清を除き、PBS (P/S) を加え 37°C のウォーターバス中に 30 分間静置し洗浄する作業を 3 回繰り返した。得られた LL3 を 1.5 ml チューブに回収し、PBS (P/S) を MSE バッファー (10 mM sodium malonate 添加) に置換してミトコンドリアを調製するまで氷中に保存した [5,21]。

2.1.5 ヤングアダルト

感染幼虫包蔵卵を LL3 と同様に、ブタ (LMS 種、雄、生後 6 ヶ月) に 1 頭当たり約 4.5×10^5 個経口摂取させた。感染 38 日目にブタの小腸を摘出した。摘出した小腸を切開し、腸壁より虫体をピンセットで回収し、これをヤングアダルト (YA) とした ([22]より改変)。

2.2 ミトコンドリア調製

2.2.1 成虫

-80°C で冷凍保存してあった成虫筋肉をミトコンドリア調製の前日より 4°C の低温室にて解凍した。トレイ上でクチクラ層を剥がし MSE バッファー (10 mM sodium malonate 添加) で洗浄した後、等量の MSE バッファー (10 mM sodium malonate 添加) を加え、ハサミで切り刻んだ。これを 50 ml のポッター型ガラス・テフロンホモジナイザーに移し、800-1,000 rpm の速度で 3 回上下させた後、懸濁液の 4 倍量の MSE バッファー (10 mM sodium malonate 添加) を加えた。50 ml 遠心管に移し、700×g、4°C で 10 分間遠心した後上清を回収し、再度 700×g、4°C で 10 分間遠心し上清を回収し、核画分や未破碎細胞を除いた。回収した上清を 20,000×g、4°C で 30 分間遠心し、沈殿に 4 倍量の MSE バッファー (1 mM sodium malonate 添加) を加え懸濁した。15 ml 遠心管に移し、20,000×g、4°C で 20 分間遠心した後、沈殿に MSE バッファー (1 mM sodium malonate 添加) を加えて懸濁した。懸濁液を 1.5 ml チューブに移して、15,000×g、4°C で 15 分間遠心し沈殿に MSE バッファー (1 mM sodium malonate 添加) を加え懸濁する作業を 3 回繰り返して洗浄した。タンパ

ク質濃度 10 mg/ml になるよう MSE バッファー (1 mM sodium malonate 添加) を加え懸濁し、これをミトコンドリア画分とし、使用するまで-80°C にて保存した [5]。

2.2.2 ヤングアダルト

虫体をハサミで半分に切り、筋肉および内臓をハサミの背を用いて濾し出してクチクラを除いた。その後の作業は成虫からのミトコンドリア調製と同様である [22]。

2.2.2 LL3

LL3 ミトコンドリアの調製方法は岩田博士等により開発された方法に従った [11]。等量の MSE バッファー (10 mM sodium malonate 添加) に懸濁した LL3 をガラスプレート (東京サイエンス : 90×75×10 mm、中央に直径 22 mm、深さ 3 mm のくぼみ) 上で外科用メス (刃 : フェザーNo.10、ハンドル : No.3) でクチクラ層を破壊するように細断した。このとき、実体顕微鏡にて 1/3 程度の長さになっていること確認した。細断した LL3 を 1 ml ダウンス型ガラスホモジナイザーに移し、手動で 20 分間ホモジナイズした後、この懸濁液を 500×g、4°C で 1 分間遠心し、核画分と未破碎細胞を除去した。上清を 10,000×g、4°C で 5 分間遠心し、沈殿に MSE バッファー (1 mM sodium malonate 添加) を加えてよく懸濁した。得られた懸濁液をミトコンドリア画分とし、使用するまで-80°C にて保存した。

各ステージで得られたミトコンドリア画分のタンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準試料とし、Lowry 法により定量した [23]。

2.3 酵素活性測定

測定には、SHIMADZU-UV3000 を使用し、サーキュレータによりセルホルダーを 25°C に保った。反応液の全量は 600 μl とし、ミトコンドリア画分は 10-20 $\mu\text{g/ml}$ 添加した。

2.3.1 SDH (コハク酸脱水素酵素) 活性

バッファー (50 mM potassium phosphate, 1 mM MgCl_2 pH 7.4) に 1 mM KCN、ミトコンドリア画分、120 $\mu\text{g/ml}$ PMS (phenazine methosulfate)、60 $\mu\text{g/ml}$ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2,4-tetrazolium bromide) を加えて転倒混和し、25°C で3分間インキュベートした。10 mM disodium succinate を添加し酵素反応を開始し、MTT の吸光度変化 ($\epsilon=1.7\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を 570 nm で測定し酵素活性を算出した [24]。

2.3.2 SQR (コハク酸-ユビキノン還元酵素) 活性

バッファー (50 mM potassium phosphate pH 7.4) に 1 mM KCN、ミトコンドリア画分、50 μM DCIP (2,6-dichloroindophenol) を加えて転倒混和し、2分間インキュベートした後、100 μM UQ_2 を添加、さらに混和後3分間インキュベートした。10 mM disodium succinate を添加し酵素反応を開始し、DCIP の吸光度変化 ($\epsilon=2.1\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を 600 nm で測定し酵素活性を算出した [18]。

2.3.3 QFR (キノール-フマル酸還元酵素) 活性

バッファー (50 mM potassium phosphate pH7.4, 0.1% (w/v) SML, 100 μ M decyl rhodoquinone (dRQ)) に 100 μ g/ml glucose oxidase、2 μ g/ml catalase、10 mM β -D-glucose、5 μ M rotenone、ミトコンドリア画分を加えて転倒混和し、2 分間インキュベートした後、300 nM NaBH₄ を添加、さらに混和後 3 分間インキュベートした。5 mM sodium fumarate を添加し酵素反応を開始し、dRQ の吸光度変化 ($\epsilon = 7.90 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を 287 nm で測定し酵素活性を算出した [25]。

2.3.4 NADH-dRQ (NADH-ロドキノン酸化還元酵素) 活性

バッファー (50 mM potassium phosphate pH 7.4) に、100 μ g/ml glucose oxidase、2 μ g/ml catalase、10 mM β -D-glucose、ミトコンドリア画分を加えて転倒混和し、2 分間インキュベートした後、50 μ M NADH を添加、さらに混和後 3 分間インキュベートした。100 μ M dRQ を添加し酵素反応を開始し、NADH の吸光度変化 ($\epsilon = 6.02 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を 340 nm で測定し酵素活性を算出した [9]。

2.3.5 NADH-FR (NADH-フマル酸還元酵素) 活性

バッファー (50 mM potassium phosphate pH 7.4) に、100 μ g/ml glucose oxidase、2 μ g/ml catalase、10 mM β -D-glucose、ミトコンドリア画分を加えて転倒混和し、2 分間インキュベートした後、50 μ M NADH を添加、さらに混和後 3 分間インキュベートした。5 mM sodium fumarate を添加し酵素反応を開始し、NADH の吸光度変化 ($\epsilon = 6.02 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を 340 nm で測定し酵素活性を算出した [9]。

2.4 キノン構成解析

2.4.1 キノン抽出

キノンはミトコンドリア調製時に得られる未破碎細胞や核を含む粗沈殿画分から抽出した。1 μ M α -tocopherol、5 mM EDTA を含む PBS と標準物質として UQ₁₀ を粗沈殿画分に加えよく懸濁した。この懸濁液に 5 倍量の hexane/ethanol (5/2, v/v) を加え、2 分間 vortex を用いて攪拌した。この懸濁液を 20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心した後上清を回収し、下層に hexane を加え 2 分間 vortex を用いて攪拌した。この懸濁液を 20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 3 分間遠心し上清を先に回収した上清と合わせ、遠心濃縮機を用いて乾燥した。乾燥したキノンを ethanol で溶解し、HPLC 解析に用いた [26]。

2.4.2 逆相 HPLC 解析

HPLC は逆相カラム (Inertsil ODS-3, 2.0 μ m, 2.1 \times 30 mm, GL Science, Tokyo) を用い、diisopropyl ether/methanol (1/4, v/v) を溶媒として 0.15 mL/min で行なった [26]。溶出されたキノンは、溶出時間および紫外部の吸収スペクトルを標準物質と比較することにより分子種を推定した。検出にはフォトダイオード検出器 (SIMADZU: SPD-10) を用い、各ピークのキノン量は、UQ ($E_{1\%1\text{ cm}}^{275\text{ nm}}=158$) および RQ ($E_{1\%1\text{ cm}}^{283\text{ nm}}=141$) より定量した [16]。

2.5 サブユニット解析

2.5.1 ウェスタンブロット

LL3、YA、成虫ミトコンドリア複合体 II のサブユニット組成の解析は、ウェスタンブロットにより解析した。

各ミトコンドリア画分は 2% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate), 6% (v/v) 2-mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 0.01% (w/v) bromophenol blue に懸濁した後、37°C で 10 分間静置することでタンパク質を変性させた。分離ゲルは、Fp サブユニットの解析には 7.5% acrylamide gel を、Ip および CybS サブユニットの解析には 10-20% gradient acrylamide gel (コスモバイオ, Cat. No. 414893) を使用した。各ステージのミトコンドリアタンパク質は SDS-PAGE で 30 mA/ゲルの条件下で分離後、トランスファーバッファー (20 mM Tris, 150 mM glycine, 10% (v/v) isopropanol, 0.2 M urea) 中、80V、4°C、1 時間でニトロセルロース膜に転写した。転写後、膜を TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20) で洗浄し、5.0% (w/v) skim milk-TBST 中、4°C で 30 分間ブロッキングした。膜を TBST で洗浄し、2.0% (w/v) skim milk-TBST で希釈した 1 次抗体を用いて、4°C で一晩振盪し反応させた。1 次抗体反応後、TBST で洗浄、2.0% (w/v) skim milk-TBST で希釈した 2 次抗体を用いて、室温で 1 時間振盪し反応させた。TBST で洗浄した後、終濃度 0.78 mM NBT (Nitro-Blue tetrazolium chloride) と 0.40 mM BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) を含むアルカリフォスファターゼ発色用のバッファー (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂·6H₂O) 中で目的のタンパク質を検出した。

各サブユニットをステージ間で比較するに当り、各ミトコンドリア画分を Ip サブユニットのバンド強度で補正して、使用するタンパク質量を決定した。バンド強度の補正にはイメージ解析プログラムである Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を利用した。

抗体は、1 次抗体には anti-Fp^A ポリクローナル (1/5000 希釈)、anti-Fp^L ポリクローナル (1/1000 希釈)、anti-Fp (Fp^A, Fp^L) ポリクローナル (1/3000 希釈)、anti-Ip ポリクローナル (1/2000 希釈)、anti-CybS^A モノクローナル (1/5000 希釈)、anti-CybS^L ポリクローナル (1/300 希釈) (表 2-1) [5]、2 次抗体には anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (BIO RAD)、anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (BIO RAD) を用いた。

2.5.2 複合体 II の可溶化

NativePAGE による解析のためミトコンドリア複合体 II の可溶化を行なった。ミトコンドリア画分を 20,000×g、4°C で 10 分間遠心し、沈殿したミトコンドリアにタンパク質濃度が 2.5 mg/ml となるよう可溶化バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 3.0% (w/v) SML (sucrose monolaurate), 2.0% (w/v) DOC (sodium deoxycholate)) を加えてよく混ぜた。氷中に 1 時間静置し複合体 II を可溶化した後、200,000×g、4°C で 5 分間遠心し、上清を可溶化画分とした ([12]より改変)。

2.5.3 high resolution Clear Native Electrophoresis (hrCNE)

Bis-Tris バッファーを用いた 8.5% (w/v) acrylamide gel ([27,28]より改変) を使用した。泳動バッファーは、陽極バッファーに NativePAGE running buffer (Invitrogen)、

陰極バッファーに NativePAGE running buffer (Invitrogen), 0.02% (w/v) DDM (*n*-dodecyl- β -D-maltoside), 0.05% (w/v) DOC 使用した [28-30]。可溶化画分に 5% (v/v) glycerol-0.01% (w/v) Ponceau S を添加してよく混ぜ、非変性の状態で分離した。開始から 1 時間は 100 V、その後 180 V 定電圧とし、4°C の低温室にて泳動した [30]。

2.5.5 SDH 活性染色

hrCNE 後のゲルを 10 mM Tris-HCl pH 7.4 で平衡化した後、10 mM Tris-HCl pH 7.4 10 ml 中に 25 mg NBT を加えた溶液に浸し、20 mM sodium succinate、60 μ g/ml PMS を加えて室温で振盪した。バッファーを MilliQ 水に置換して反応を停止した [30]。

2.5.6 2次元電気泳動

hrCNE 後のゲルを 1 レーン切り出し、2次元目の 13% acrylamide gel にセットして SDS-PAGE を行ない、ウエスタンブロット法を用いて、目的のサブユニットを検出した。

2.6 定量 RT-PCR

2.6.1 RNA 抽出

凍結した受精卵、L3、LL3、YA、成虫筋肉を液体窒素で冷却した乳鉢を用いて破碎し、続けて、RNA 抽出用試薬 TRIzol LS Reagent (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。方法は付属のプロトコルに従った。ただし、大量に含まれる多

糖類、筋線維、クチクラ等を除くため、chloroform を添加する前に 12,000×g、4°C で 10 分間の遠心を追加した。最終的に得られた沈殿は DEPC (diethylpyrocarbonate) 処理した超純水に溶解し、-80°C にて保存した。

受精卵、L3、YA、成虫の RNA 抽出は、東京大学大学院医学系研究科、生物医化学教室の後藤美穂博士によって同様の方法で行なわれた。

2.6.2 RNA の定量

total RNA 溶液中に存在する DNA を除去するため、DNase I (Invitrogen) を用いて DNase 処理を行なった。Phenol-chloroform 抽出により DNase を除いた後、cDNA 合成の鋳型とする total RNA 量を一定とするため、total RNA の定量を行なった。蛍光試薬 Ribo Green RNA Quantification Reagent and kit (Molecular Probes) を用いて RNA を標識し、500 nm で励起を行なった後、525 nm での蛍光を分光蛍光光度計 FP-6300DS (日本分光) により測定した。検量線作成にはキットに添付された標準試料を使用した。

2.6.3 cDNA 合成

抽出した total RNA 1 µg を鋳型に、SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を用いて付属のプロトコルに従い、cDNA を合成した。

2.6.4 real-time PCR

15 ng 相当の total RNA から合成した cDNA を鋳型として、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)、LightCycler (Roche) を用いて付属のプロトコルに従い、

real-time PCR を行なった。それぞれに使用したプライマーは表 2-2 に記した。PCR 反応は以下のように設定した：94°C で 15 分 (1 サイクル)；94°C で 15 秒、55°C で 30 秒、72°C で 10 秒の反応を 40 サイクル。

2.7 阻害剤の検討

2.7.1 阻害剤

阻害効果を調べる Flutolanil と構造の類似した化合物として、東京大学大学院薬学系研究科、有機反応科学教室の井上将行教授、松岡茂博士によって合成された Flutolanil 誘導体 (図 2-1)、市販の化合物 (図 2-2)、日本農薬株式会社所有の化合物 (図 2-3) を用いた。

各化合物の DMSO 溶液 100 mM を調製し、希釈系列には ethanol を用いた。ただし、100 mM で溶解しなかった化合物については 10 mM または 1 mM になるようにさらに DMSO (dimethyl sulfoxide) を加え溶解した。各測定には 1-9 μ l の阻害剤溶液を添加した。

2.7.2 複合体 II の活性化

単離したミトコンドリアのコハク酸結合部位にはオキサロ酢酸が強く結合している。これを解離させることにより複合体 II を活性化した。回虫ミトコンドリア (5 mg/ml) またはブタミトコンドリア (10 mg/ml) に 340 nM sodium malonate を加えて室温に 30 分静置した後、氷上に保存したものをサンプルとして使用した。

2.7.3 SQR 活性測定

測定には、SHIMADZU-UV3000 を使用し、サーキュレータによりセルホルダーを 25°C に保った。反応液の全量は 1 ml とした。バッファーには 50 mM potassium phosphate pH7.4, 0.1% (w/v) SML, 60 μ M UQ₂ (調整後 25°C で 20 分以上静置した) を使用した。

バッファーに 2 mM KCN を添加し、活性化したサンプル 3 μ l を加えて転倒混和し、目的濃度の阻害剤を添加、さらに混和後、25°C で 3 分間インキュベートした。10 mM disodium succinate を添加し酵素反応を開始し、UQ₂ の吸光度変化 ($\epsilon=1.5\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) を 278 nm で測定し酵素活性を算出した。

2.7.4 阻害強度の評価

阻害曲線を作成し、酵素活性が 50%になる阻害剤濃度、IC₅₀ の値を求めた。阻害剤原液の希釈系列の最大濃度が 10 mM または 1 mM、また反応液への溶解限度があり、測定出来る最大の阻害剤濃度は 90 μ M または 9 μ M であった。そのため、IC₅₀ を求められないものは、50%阻害の値、30-49%阻害の場合は 50%阻害の外挿値を求め、阻害効果の参考とした。

サブユニット	抗体名 Lot. no	希釈度	抗体の種類	作成者
Fp ^A	Fp1-1 Lot: 122-675510	1/5000	rabbit IgG monoclonal	ペプチド研, Amino
Fp ^L	Fp2-1 Lot: 122-675410	1/1000	rabbit IgG monoclonal	ペプチド研, Amino
Fp ^A , Fp ^L	1A3/1D9 の 2/B9/C11 Lot: 32-6	1/3000	mouse IgG polyclonal	Ma
Ip, CybS ^A , CybS ^L	A.s. complex II Lot: 870110	1/2000	rabbit IgG polyclonal	Kita
CybS ^A	3A1/F4/G5 Lot: 16-5	1/5000	mouse IgG monoclonal	Ma
CybS ^L	CybSL Lot: 112-652611	1/300	rabbit IgG polyclonal	ペプチド研, Amino, Shinjyo

表 2-1 ウェスタンブロットに使用した抗体

サブユニット		Number	塩基配列
Fp ^A	F	P-3662	TCATTGAGATGCCACTGCAC
	R	P-3663	CCACAATTGTCCGCTTTGAG
Fp ^L	F	P-3658	GTTGGAGGGACAGGTCAAG
	R	P-3659	CGGTCTCGCTCTTATCTAACG
Ip	F	P-3666	GCATCTGCAACATCGATCAG
	R	P-3667	TGGATGGAAGCGTATTGAGC
CybS ^A	F	P-3664	AAGCCTCTACATAGCCATGG
	R	P-3665	GTGGACGTGCAGAGTAAGTG
CybS ^L	F	P-3660	CTACACCTGTGTCAAGGGAAC
	R	P-3661	ACGATAGCGACCGTTAGTACG
CybL	F	P-3668	CATGGGTGATCCTCGATACC
	R	P-3669	GCACCTCTATAGATCGACGG

表 2-2 定量 RT-PCR に用いたプライマー

化合物	構造	化合物	構造
6a		JIM-9	
7a		JIM-10	
8		JIM-11	
9a		JIM-12	
JM-1-114		JM-198	
JM-1-141a		JM-2-91	
JM-181-P		JM-2-95	
JM-1-141b			

図 2-1 阻害剤 1 : 合成した Flutolanil 誘導体

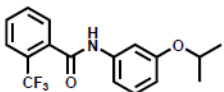
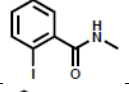
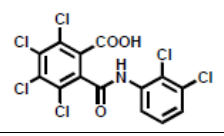
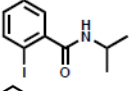
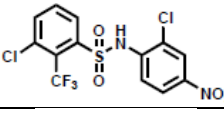
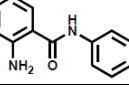
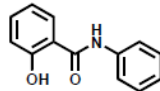
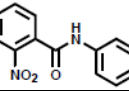
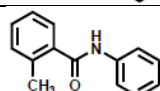
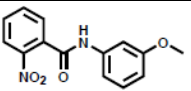
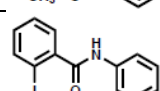
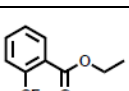
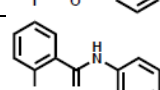
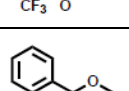
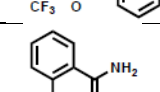
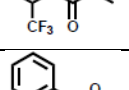
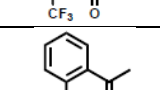
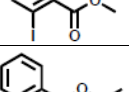
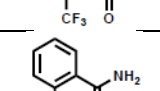
化合物	構造	化合物	構造
Flutolanil		N-methyl-2-iodobenzamide	
Tecloftalam		IME	
Flusulfamide		2-aminobenzanilide	
Salicylanilide		2-nitro-N-phenylbenzamide	
Mepenil		3'-methoxy-3-nitrobenzanilide	
Benodanil		Ethyl 2-(trifluoromethyl)benzoate	
2-(trifluoromethyl)benzanilide		Methyl 2-(trifluoromethyl)benzoate	
2-(trifluoromethyl)benzamide		Methyl 2-iodobenzoate	
2'-trifluoromethylacetophenone		Ethyl 2-iodobenzoate	
2-iodobenzamide			

図 2-2 阻害剤 2 : 市販の Flutolanil 類似化合物

化合物	構造	化合物	構造
NN-1		NN-12	
NN-2		NN-13	
NN-3		NN-14	
NN-4		NN-15	
NN-5		NN-16	
NN-6		NN-17	
NN-7		NN-18	
NN-8		NN-19	
NN-9		NN-20	
NN-10		NN-21	
NN-11		NN-22	
		NN-23	

図 2-3 阻害剤 3 : 日本農薬所有の化合物

第3章

LL3 およびヤングアダルトにおけるミトコンドリア呼吸鎖の生化学的解析

3.1 序論

ブタ回虫 (*A. suum*) の宿主体内移行における環境の変化に適応したエネルギー代謝の変動を、ミトコンドリア呼吸鎖の解析により明らかにすることを目的として、特に呼吸鎖複合体 II に注目して研究を進めてきた。これまでに、L3、実験宿主であるウサギから回収した LL3、成虫について解析が行なわれ、複合体 II の酵素学的解析、サブユニット組成の解析より、複合体 II の体内移行期における変換のタイミング、代謝系変動への関与が明らかにされつつある。しかし、LL3 から成虫へと成長するまでは少なくとも 1 回の脱皮、寄生部位の変化など多くの段階が残っている。また LL3 のエネルギー代謝系は好氣的から嫌氣的環境への適応期であるが、成虫では嫌氣的エネルギー代謝系への転換が完了している。この好氣的-嫌氣的エネルギー代謝系の転換を理解するためには、LL3 から成虫へと成長するまでのエネルギー代謝の変化を明らかにする必要がある。さらに、抗寄生性線虫薬の開発を考えたとき、薬剤の効果的な標的となる時期を特定する上で、各ステージにおけるミトコンドリア呼吸鎖、複合体 II の詳細な情報は必須である。

本研究では肺 (pO₂: 13.2%) から小腸 (pO₂: 2.5-5.0%) への移行で環境の酸素分圧が大きくに変化する LL3 と成虫の間のステージで、小腸に到達し成虫に成長する直前の段階のヤングアダルト (YA) に関して、感染 38 日目の虫体を用いてミトコンドリア呼吸鎖の生化学的解析、複合体 II の酵素学的解析およびサブユニ

ット組成の解析を行なった (図 3-1)。

3.2 結果

3.2.1 ミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性測定

NADH-フマル酸還元系は嫌氣的代謝系のミトコンドリア呼吸鎖で PEPCK-コハク酸経路の最終ステップであり、複合体 I、複合体 II と RQ から構成されている。LL3、YA および成虫の酵素活性測定の結果を表 3-1 と図 3-2 に示した。

SQR はコハク酸から UQ への電子の受け渡しを触媒する。この SQR 活性は、YA (352 ± 28.6 nmol/min/mg) は、成虫 (467 ± 5.25 nmol/min/mg) の約 0.75 倍、LL3 (158 ± 8.63 nmol/min/mg) の約 2.2 倍となった (表 3-1、図 3-2A)。一方、QFR は NADH-フマル酸還元系の末端酸化酵素であり、SQR の逆反応として機能する。QFR 活性は、成虫 (70.1 ± 3.69 nmol/min/mg) と YA (75.6 ± 0.13 nmol/min/mg) は同程度の値を示し、LL3 (28.9 ± 7.85 nmol/min/mg) は最も低い値を示した (表 3-1、図 3-2B)。また、NADH-dRQ は NADH-フマル酸還元系で働く複合体 I である。NADH-dRQ 活性は成虫 (122 ± 7.10 nmol/min/mg)、YA (124 ± 1.76 nmol/min/mg) と LL3 (123 ± 8.26 nmol/min/mg) とで同程度の値を示した (表 3-1、図 3-2C)。

さらに、複合体 I と複合体 II の複合活性である NADH-FR 活性は、成虫 (104 ± 7.27 nmol/min/mg) が最も高く、YA (34.9 ± 1.56 nmol/min/mg) は成虫の約 0.33 倍、LL3 (9.79 ± 5.44 nmol/min/mg) は YA の約 0.09 倍となった (表 3-1、図 3-2D)。この様に YA の複合体 I (NADH-dRQ)、複合体 II (QFR) は成虫と同程度の活性を示したが、これらの複合活性である NADH-FR 活性は YA において成虫より低い活性

を示した。

3.2.2 キノン構成の解析

キノン種はミトコンドリア呼吸鎖において酵素間の電子伝達を行なう重要な構成因子である。逆相カラムによる HPLC を用いてキノン構成を解析し、各ステージの RQ/UQ 比を比較した (図 3-3)。ただし、受精卵、L3、成虫の結果は [16] より引用した。回収できたミトコンドリア画分が限られていたため、LL3 および YA のミトコンドリア調製の過程で得られた未破碎細胞や核を含む粗沈殿画分からキノン抽出した。各ステージの RQ/UQ 比を比較する前に、成虫とウサギから回収した LL3 の粗沈殿画分から抽出したキノンの構成比 (データ未掲載) とミトコンドリア画分から抽出したキノンの構成比 [11] が一致することを確認した。

解析の結果、LL3、YA および成虫の RQ/UQ 比はそれぞれ、49/51、100/0、100/0 となった (図 3-3)。このように YA において UQ から RQ へのキノンの転換は完了していることが示された。

3.2.3 複合体 II のサブユニット組成解析

各ステージの複合体 II のサブユニット組成をウエスタンブロットを行ない解析した。回虫の生活環を通じて Ip と CybL サブユニットは共通なので、LL3、YA、成虫のミトコンドリア画分を Ip サブユニットのバンド強度で補正し、LL3 : YA : 成虫のタンパク質量を 2.5 : 0.41 : 1.0 に決定した。

CybS サブユニットについて、10-20% acrylamide gradient gel を用いた SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロットを行なった。CybS^A の LL3 : YA : 成虫の

比は 0.48 : 0.77 : 1.0 となった。CybS^Lは LL3 のみが検出され、YA と成虫は検出されなかった (図 3-4D, E)。

Fp サブユニットについて、7.5% acrylamide gel を用いた SDS-PAGE で分離し、ウエスタンブロットを行なった。Anti-Fp^A、anti-Fp^Lを用いて解析したところ LL3 : YA : 成虫の比は Fp^A で 0.32 : 0.03 : 1.0、Fp^L で 1.0 : 0.54 : 0.26 となった (図 3-4A, B)。次に複合体を形成している YA の複合体 II の Fp サブユニットを調べるため、1次元目に hrCNE、2次元目に SDS-PAGE を行なった。hrCNE 後の SDH 活性染色の結果、明瞭な単一のバンドが検出できた (図 3-5A)。2次元目の SDS-PAGE 後、anti-Fp^A、anti-Fp^L を用いてウエスタンブロットを行なった。YA において、Fp^A、Fp^L ともに複合体を形成した複合体 II の位置に検出された (図 3-5B, C)。そこで、Fp^A、Fp^L の両者を検出する anti-Fp を用いて Fp^A、Fp^L のどちらが YA 複合体 II で優位な Fp として発現しているかを確認した。その結果、Fp^A : Fp^L の比は LL3 で 1.0 : 0.83、YA で 1.0 : 1.4、成虫で 1.0 : 0.16 となり、YA において Fp^L が優位に発現していることが示された (図 3-4C)。これらの結果から、YA において Fp^A は LL3 の 1/10 に低下し、Fp^L が優位に発現していることが示された。

さらに、各ステージにおける複合体 II の各サブユニットの mRNA 発現量を real-time PCR を用いて解析した。すべてのサブユニットについて成虫での mRNA 発現量を 1.0 としてステージ間の比較を行なった。YA での CybS^A の mRNA 発現量は成虫の 2.1 倍、CybS^L の mRNA 発現量は成虫と同程度で L3 や受精卵に比較すると低い値となった (図 3-6)。さらに、YA の Fp^A と Fp^L mRNA 発現量はそれぞれ成虫の 3.8 倍、1.2 倍であった (図 3-6)。

3.3 考察

ブタ回虫 (*A. suum*) の宿主体内移行における環境の変化に適応したエネルギー代謝の変動を、ミトコンドリア呼吸鎖の解析により明らかにすることを目的として、特に呼吸鎖複合体 II に注目して研究を進めてきた。これまでに L3、LL3、成虫について複合体 II の酵素学的解析、サブユニット組成の解析が行われ、複合体 II の体内移行期における変換のタイミング、代謝系変動への関与が徐々に明らかにされつつある。複合体 II はその構成成分である Fp、Ip、CybL、CybS サブユニットのうち、Ip、CybL サブユニットはステージ間で共通であるのに対し Fp、CybS サブユニットはステージ特異的なアイソフォームの存在が明らかにされている。成虫筋肉では成虫型複合体 II (Fp^A、CybS^A)、L3 では幼虫型複合体 II (Fp^L、CybS^L)、実験宿主であるウサギから回収した LL3 では混合型複合体 II (Fp^L、CybS^A) の存在が確認されていて、Fp と CybS の成虫型-幼虫型の転換は LL3 で起こり、この 2 つの転換は同時には起こらず、最初に CybS が転換し、続いて Fp が転換することが明らかになっている。

本研究では、さらに LL3 から成虫となるまでのエネルギー代謝の変化を追うため、ヤングアダルト (YA) として感染後 38 日目で小腸に寄生している虫体の複合体 II の酵素学的解析およびサブユニット組成の解析、キノン構成の解析を行なった。YA は体長約 6 cm で成虫の 1/5 程度と小さいが (図 3-1)、棲息部位、形態は成虫と同様である。また、LL3 と YA はサンプルが限られていて精製複合体 II を得ることは困難であったため、すべてのステージにおいてミトコンドリア画分を用いて解析を行なった。

NADH-フマル酸還元系は複合体 I (NADH-キノン還元酵素)、RQ (電子受容体)、複合体 II (QFR)から構成される嫌氣的ミトコンドリア呼吸鎖である。YA の NADH-dRQ 活性、QFR 活性は成虫と同程度の値となったが、その複合活性である YA の NADH-FR 活性は成虫の 1/3 と低下していた。YA の NADH-FR 活性が低下していたので、可能性の一つとして NADH-フマル酸還元系のもう一つの構成要素であるキノン構成が YA と成虫で異なっていると考え、キノン構成を調べた。予想に反して YA のキノンは成虫と同様に 100%RQ であった。つまり、NADH-フマル酸還元系の個々の NADH-dRQ 活性、QFR 活性、キノン構成はすべて YA と成虫は同様であったが、これらの活性の全てから構成される YA の NADH-FR 活性は成虫と比較し、1/3 程度の値であった。YA の NADH-FR 活性が成虫と比較し低いことに関して、キノン構成は 100%RQ であったが、RQ の絶対量が YA と成虫とで異なることが考えられるが、キノンの絶対量の測定は試料の量から現段階では困難である。

複合体 II のサブユニット組成をウエスタンブロット法を用いて解析した結果、LL3 では Fp^A 、 Fp^L 、 $CybS^A$ 、 $CybS^L$ が検出され、YA では Fp^A 、 Fp^L 、 $CybS^A$ が検出された。また、キノン構成について LL3 の RQ は 50%であったのに対し YA はすべて RQ であった。YA において複合体 II の $CybL$ 、 $CybS$ 、キノンからなる疎水性部位の転換は完了していることが示された。これらの結果より $CybS$ とキノンの転換は同時に起こることが明らかになり、RQ の複合体 II への結合には $CybS^A$ が必要であることが示唆された。

興味深いことに、LL3 において Fp^A と Fp^L のタンパク質発現量は同程度であったが、ステージの進んだ YA において Fp^L のタンパク質発現量が Fp^A より高いことが明らかになった。また、LL3、YA、成虫の Fp^A タンパク質発現量を比較すると、

YA で Fp^A が低下していることが示され、YA において優位に発現している Fp は Fp^L であることが明らかになった。しかし、mRNA の発現は Fp^A が優位であり、タンパク質発現と mRNA 発現の変化は一致しなかった。これらの結果より、LL3 から YA になる間に Fp^L の発現量が上昇し、YA では環境に適応するため、 Fp^A 合成の準備が開始されると考えられる。YA の複合体 II は成虫型複合体 II、混合型複合体 II の両方が存在し、混合型複合体 II が優位に存在することが明らかになった。

NADH-FR 活性が YA において低かったことに関して、キノン構成以外にも一つの可能性として複合体 II の存在様式が異なることが原因と考えられる。酵母と哺乳類ミトコンドリアにおいて複合体 I-III-IV のスーパーコンプレックスを形成し電子伝達を行なうという報告がある [31]。また最近、ヒトミトコンドリアにおいて複合体 II が、ピリミジン合成系で第 4 個目の酵素でやはりキノンへの電子伝達を行なう、ジヒドロオロト酸脱水素酵素と複合体を形成しているとの報告もある [32]。回虫ミトコンドリアにおいても呼吸鎖複合体がスーパーコンプレックスを形成している可能性はあり、混合型複合体 II は成虫型複合体 II と異なり複合体 I とのスーパーコンプレックスを形成できず NADH-フマル酸還元系において電子伝達の効率が異なる可能性が考えられる。

さらに、固有宿主であるブタから回収した LL3 (LL3 (ブタ)) の結果と以前に報告した実験宿主であるウサギから回収した LL3 (LL3 (ウサギ)) の結果 [11] に相違があった。まず、LL3 (ブタ) の QFR 活性は成虫より低い値であったのに対し、LL3 (ウサギ) の QFR 活性は成虫より高い値を示した (表 3-1、[11])。さらに、LL3 (ブタ) において Fp^A と Fp^L のタンパク質発現量は同程度であったのに対し、LL3 (ウサギ) では Fp^L が Fp^A の 2 倍量であった (図 3-6、[11])。これらの違いは宿主応答の

解明にヒントを与える可能性がある。実際に肺の症状は非固有宿主であるウサギのほうが出血や炎症が強く、宿主からの攻撃など幼虫にとっての環境は大きく異なっていると考えられる。

以上まとめると、本研究ではブタ回虫の宿主体内移行におけるミトコンドリア呼吸鎖の変動を、特に LL3 から YA を経て成虫に至る過程について調べた。最初に、固有宿主であるブタから回収した LL3 の複合体 II は実験宿主であるウサギから回収した LL3 の複合体 II と生化学的に異なることが示された。次に、YA の主要な複合体 II は混合型複合体 II で、さらに LL3 の混合型複合体 II より存在比が多いことがわかった。これが YA の NADH-dRQ 活性、QFR 活性、キノン構成が成虫と同様であるにもかかわらず、これらの複合活性である NADH-FR 活性が成虫より低い理由の可能性と考えられる。まとめると、YA はサイズは異なるもののその形態、棲息部位は成虫と同様である一方、ミトコンドリア呼吸鎖の幼虫型から成虫型への転換は完了していないことが示された。好氣的-嫌氣的エネルギー代謝転換における複合体 II の役割を明らかにするため、今後各複合体 II の *in vitro* タンパク質合成を確立し、その酵素学的な性質を詳細に解析する必要がある。

	比活性 (nmol/min/mg)					
	LL3		YA		成虫	
SDH	87.1	± 1.87	150	± 21.4	277	± 5.55
SQR	158	± 8.63	352	± 28.6	467	± 5.25
QFR	28.9	± 7.85	75.6	± 0.13	70.1	± 3.61
NADH-dRQ	122	± 7.10	124	± 1.76	123	± 8.26
NADH-FR	9.79	± 5.44	34.9	± 1.56	104	± 7.27

表 3-1 LL3、YA、成虫の酵素活性測定
LL3、YA、成虫の SDH、SQR、QFR、NADH-dRQ、NADH-FR 活性の比活性

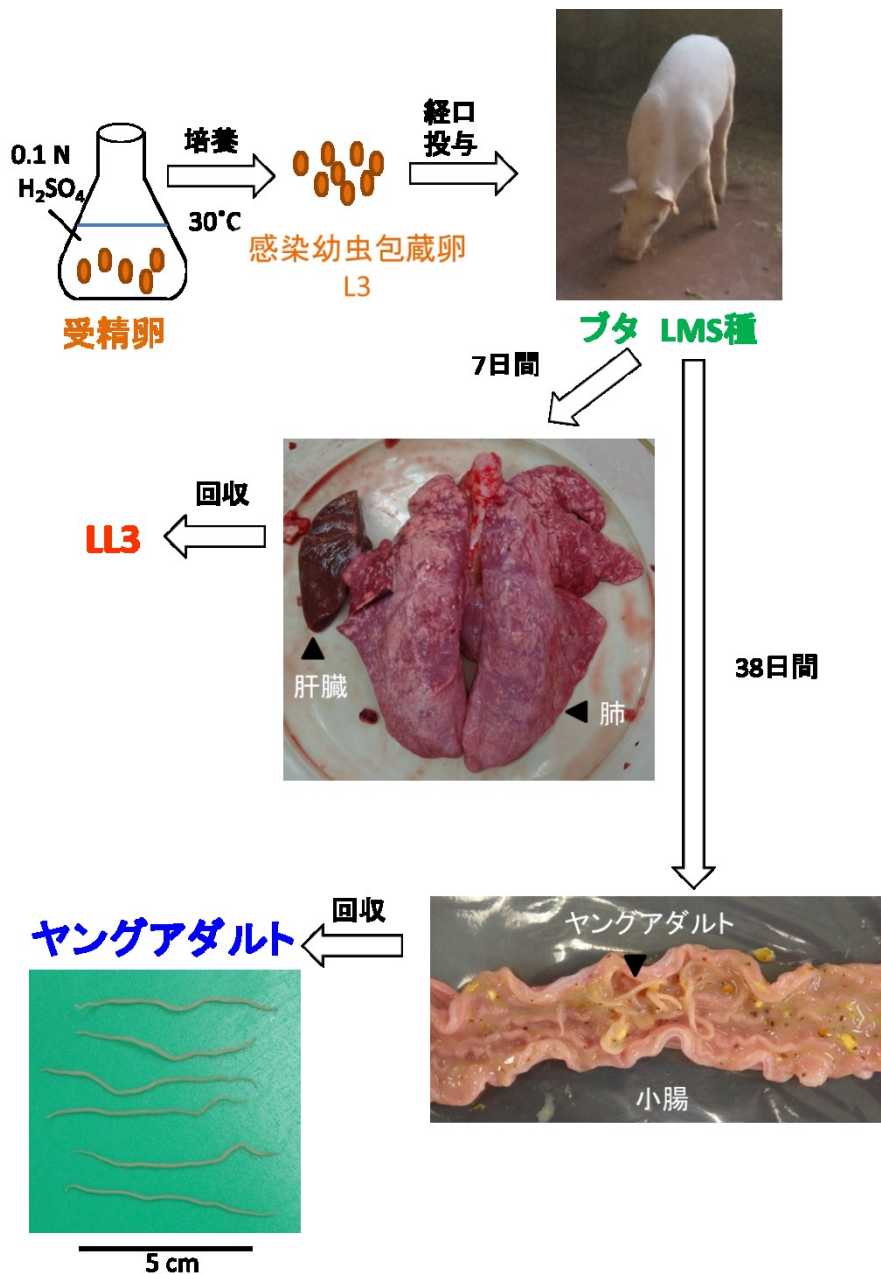


図 3-1 LL3、ヤングアダルトの回収

受精卵を懸濁通気培養法で培養した L3 をブタに経口感染させ、7 日目の肺から LL3 を、38 日目の小腸からヤングアダルトを回収した。

肝臓、肺ともにミルクスポットが見られた。ウサギの肺のような激しい出血はブタの肺には確認されなかった

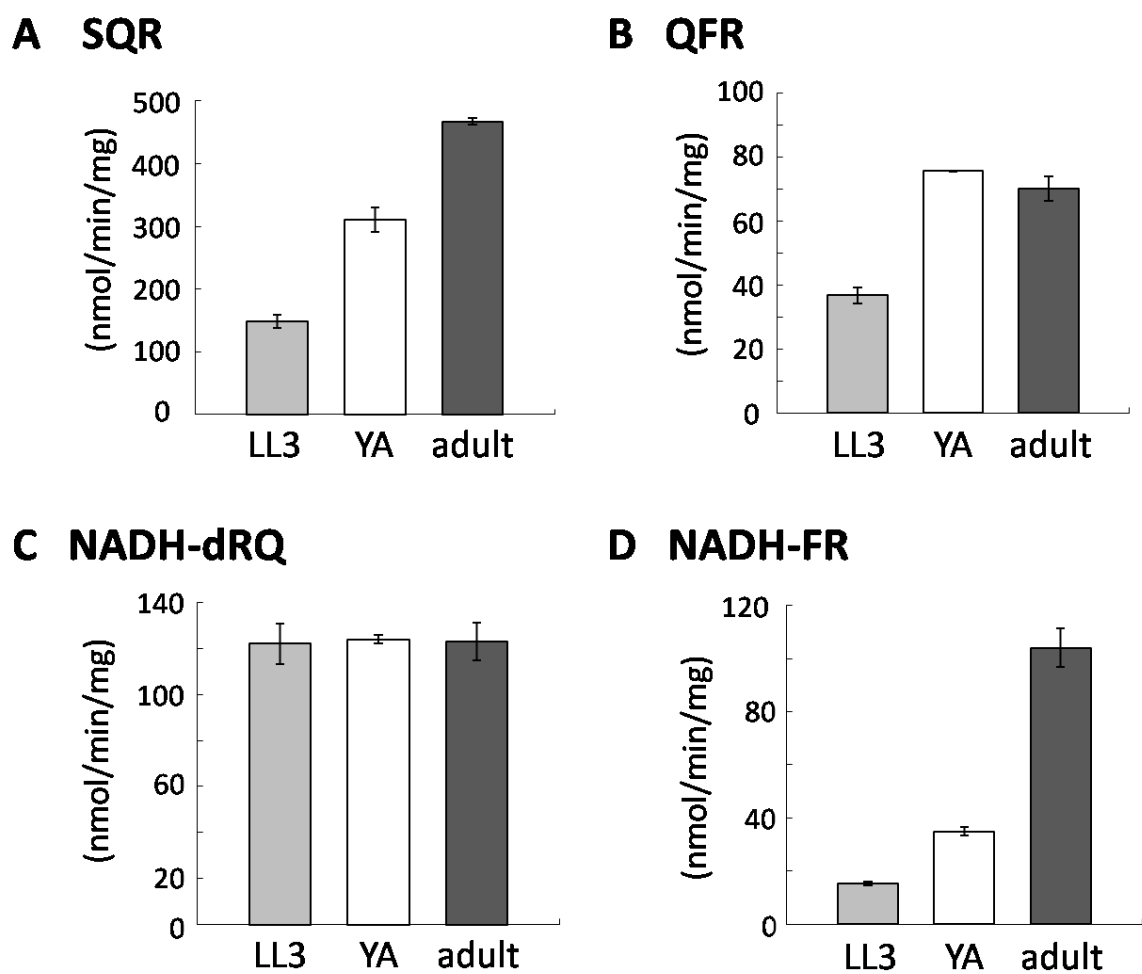
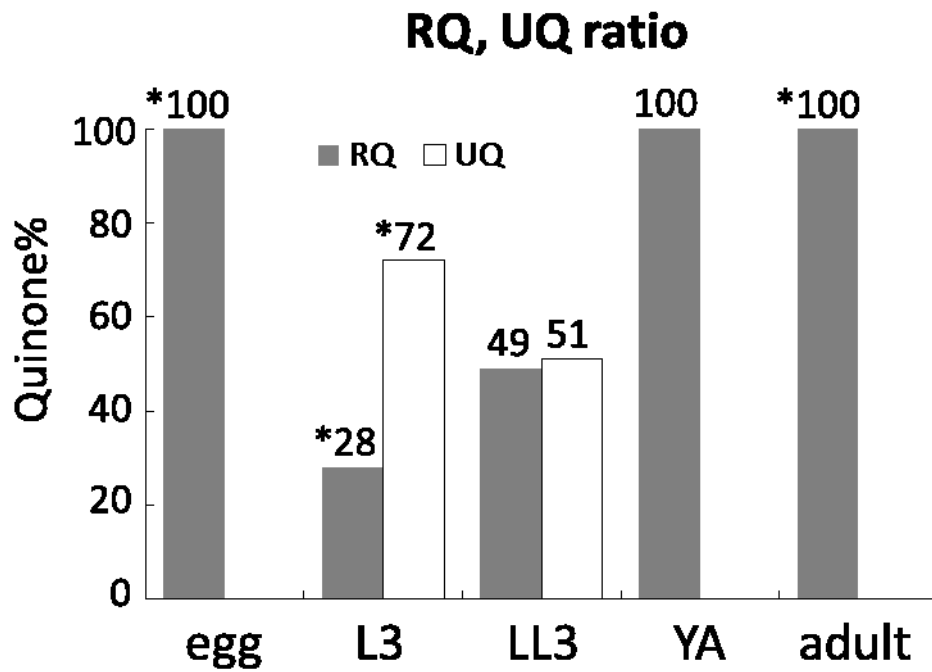


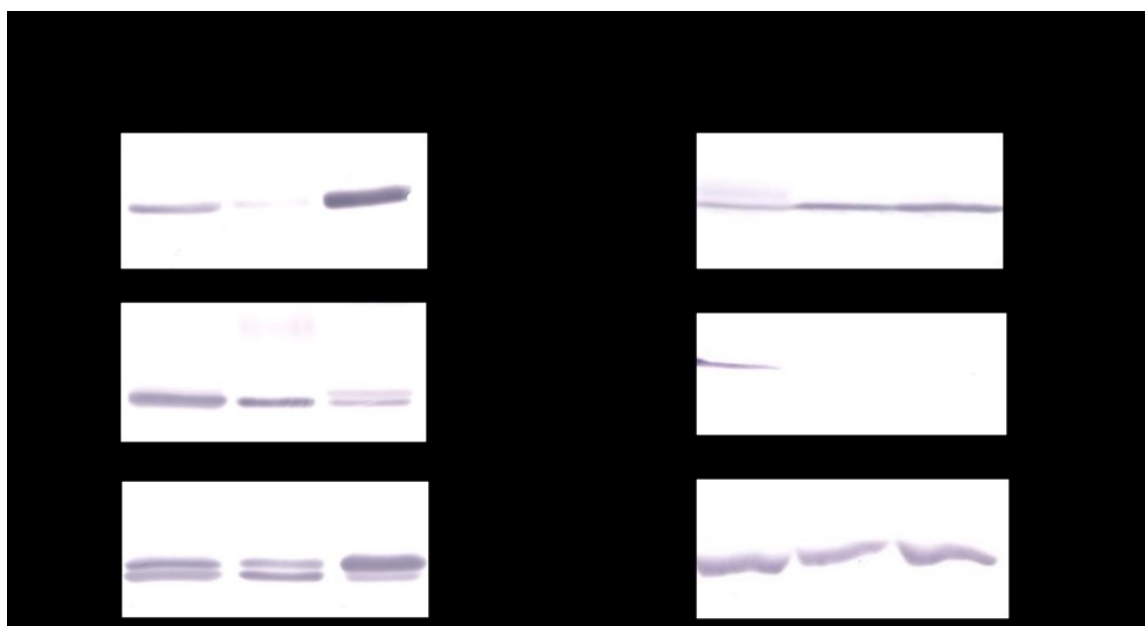
図 3-2 LL3、YA、成虫ミトコンドリアの酵素活性

A) SQR 活性、B) QFR 活性、C) NADH-dRQ 活性、D) NADH-FR 活性の各ステージの比較



ステージ	RQ/UQ
LL3	49/51
YA	100/0
Adult	100/0

図 3-3 各ステージにおけるキノン構成
 受精卵、L3、LL3、YA、成虫における RQ/UQ 比。*) [16]より引用。



	LL3	YA	adult
Fp ^A	0.32	0.03	1.0
Fp ^L	1.0	0.54	0.26
CybS ^A	0.48	0.77	1.0
CybS ^L	LL3のみ		

	LL3	YA	成虫
Fp ^A	1.0	1.0	1.0
..
Fp ^L	0.83	1.4	0.16

図 3-4 複合体 II 各サブユニットのウエスタンブロット解析

Fp^A、Fp^L、CybS^A、CybS^L、Ip サブユニットを表 2-1 に示す抗体で検出した。Ip のバンド強度で各ステージのタンパク質量を決定した。A) Fp^A、B) Fp^L、C) Fp^A · Fp^L、D) CybS^A、E) CybS^L、F) Ip の結果を示した。各サブユニットの LL3 : YA : 成虫比を下に示した。

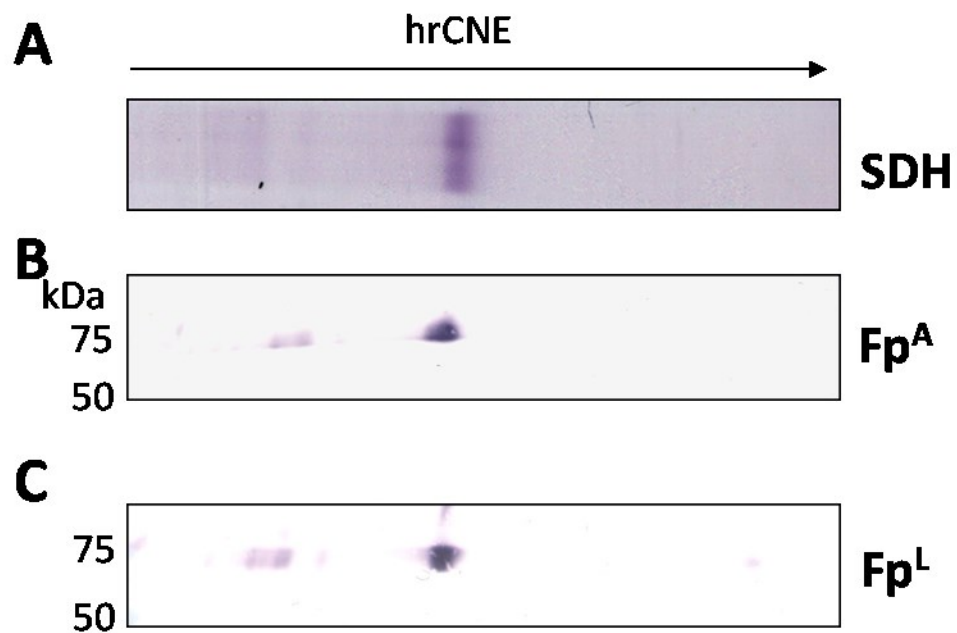


図 3-5 複合体を形成した YA の複合体 II

複合体を形成した Fp を検出するため、A) 1次元目に hrCNE と SDH 活性染色で複合体を形成した複合体 II を検出した。2次元目に SDS-PAGE とウエスタンブロット解析を行ない B) Fp^A、C) Fp^L を検出した。

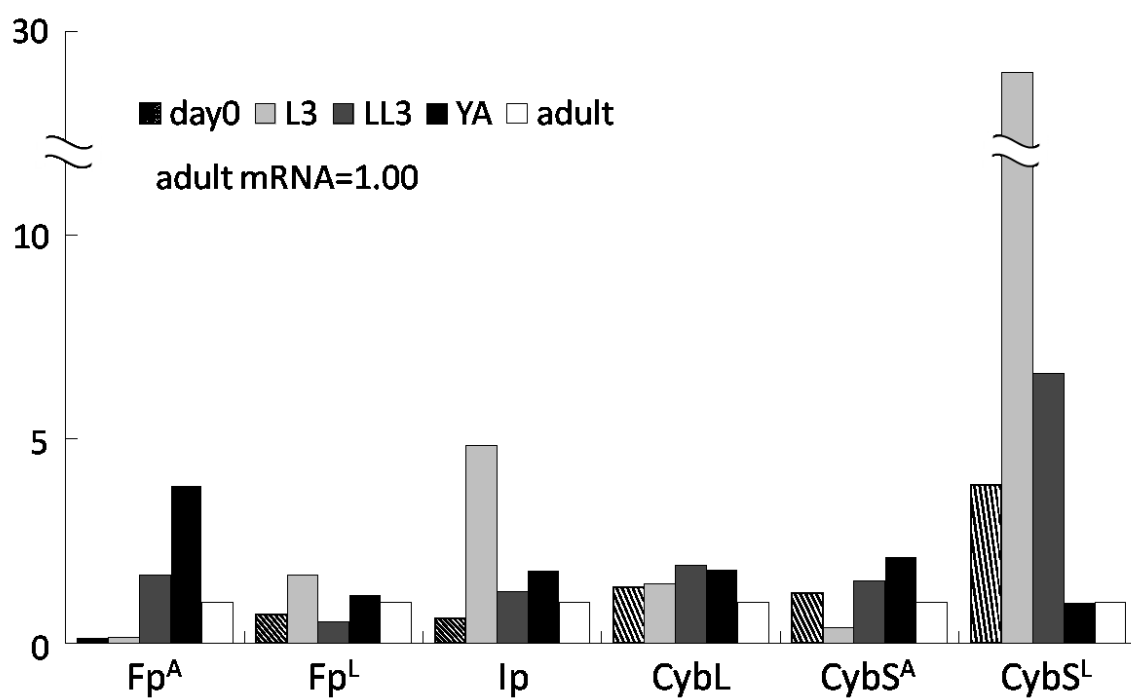


図 3-6 mRNA 発現量の比較

成虫の mRNA 発現量と 1.0 として、各サブユニットの各ステージにおける発現量の比を示した。

第4章

ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II を標的とした阻害剤の検討

4.1 序論

現在使用されている抗寄生性線虫薬は複数存在するが、特にヒツジの寄生虫である *Haemonchus contortus* に関しては、薬剤耐性株の出現により新規薬剤の開発が急務となっている。寄生性線虫の持つ NADH-フマル酸還元系は哺乳類のミトコンドリアには存在せず、格好の薬剤標的になると考えられ、私の所属するグループはこれまでにブタ回虫をモデルとして使用した阻害剤の検討を行ってきた。複合体 I として nafuredin、quinazoline 系阻害剤を見出ししたが、どちらも高い選択性の化合物が得られず、薬剤に至っていない。しかし、動物実験等 [9,17] により NADH-フマル酸還元系が良い薬剤標的となりうると示されたことから、本研究では複合体 II に関して検討した。

NADH-フマル酸還元系の末端酸化酵素である複合体 II は QFR として機能し、宿主である哺乳類の複合体 II とは異なる機能を有していることが明らかにされている。実際に、回虫の複合体 II を特異的に阻害する薬剤として Flutolanil を報告している [12]。Flutolanil の回虫のミトコンドリア複合体 II に対する IC_{50} は 58.1 nM、宿主であるブタのミトコンドリア複合体 II に対する IC_{50} は 45.9 μ M であり選択性は 790 倍である。また、回虫成虫の複合体 II は結晶構造が解析され、さらに RQ、Flutolanil との共結晶の解析が進み、薬剤開発に重要な知見が得られている [15,33]。

そこでさらなる選択性の向上を目指し、阻害剤の構造と阻害活性の関係についての知見を得るため、Flutolanil と構造の類似した化合物である、合成した Flutolanil 誘導体 15 種、市販化合物 19 種、および日本農薬株式会社所有の化合物 23 種について回虫複合体 II とブタ複合体 II に対する阻害強度を調べた。

4.2 結果と考察

本実験においては多数の化合物の検討を行なうため、また回虫ミトコンドリアに対する Flutolanil、NN-23 の IC_{50} は SQR 活性、QFR 活性どちらで測定しても違いはなかったため (データ未掲載)、測定が簡便な SQR 活性に対する阻害効果を検討した。

4.2.1 溶媒の酵素活性に対する影響の検討

阻害剤の溶媒の回虫およびブタミトコンドリアの SQR 活性に対する影響を検討するため、溶媒のみを添加して各酵素活性を測定した。DMSO および ethanol はともに 1 ml の反応液に対して 9 μ l までは SQR 活性を変化させなかった (データ未掲載)。よって阻害剤の添加量は最大 9 μ l までとした。

4.2.2 化合物の選択

Flutolanil を図 4-1 のように左側のトリフルオロメチルベンゼン、中央のリンカーと右側のイソプロポキシベンゼンの 3 つの部位に分け、それぞれの部位で異なる

る置換基を持つ化合物を選択、または合成した。日本農薬所有の化合物は、合成した化合物、市販の化合物の検討で得られた構造活性相関の知見をもとにフィードバックし、Flutolanil に類似の化合物を選択した。

4.2.3 トリフルオロメチル基の効果

前述のとおり、Flutolanil の回虫のミトコンドリア複合体 II に対する IC₅₀ は 58.1 nM、ブタのミトコンドリア複合体 II に対する IC₅₀ は 45.9 μM である。Flutolanil のトリフルオロメチル基をカルボキシル基 (JM-181-P)、ヨード基 (JIM-12)、メチル基 (Mepronil) に置換したときの回虫ミトコンドリアに対する IC₅₀ は、90 μM にて 20%阻害、72.3 nM、515 nM、ブタミトコンドリアに対する IC₅₀ は、90 μM にて阻害しない、6.43 μM、90.0 μM となった (図 4-2、上段)。2-(trifluoromethyl)benzanilide (回虫 : 90 μM にて 20%阻害、ブタの IC₅₀ : 35.6 μM) のトリフルオロメチル基をニトロ基 (2-nitro-N-phenylbenzamide)、ヨード基 (Benodanil)、メチル基 (Mepenil)、水酸基 (Salicylanilide)、アミノ基 (2-aminobenzanilide) に置換したときの回虫に対する IC₅₀ は、72.5 nM、50.0 nM、489 nM、1.90 μM、5.97 μM、ブタに対する IC₅₀ は、9 μM にて 15%阻害、25.5 μM、90 μM にて 15%阻害、90 μM にて 10%阻害、9 μM にて阻害しないとなった (図 4-2、下段)。これらより、トリフルオロメチル基の位置に導入した置換基の電子吸引性、供与性と IC₅₀ に相関があることわかった (図 4-2)。置換基の電子吸引性は -NO₂ > -CF₃ > -COOH > -I > -CH₃ > -OH > -NH₂ であり、両複合体 II に対する IC₅₀ の傾向は -NO₂ (2-nitro-N-phenylbenzamide) = -CF₃ (Flutolanil, 2-(trifluoromethyl) benzanilide) < -I (JIM-12, Benodanil) < -CH₃ (Mepronil, Mepenil)

<-OH (Salicylanilide) <-NH₂ (2-aminobenzanilide) <-COOH (JM-181-P) となった。置換基が電子供与性であるほど、回虫複合体 II に対してもブタ複合体 II に対しても阻害強度が低下していることがわかる。例外的に 2-(trifluoromethyl)benzanilide は回虫ミトコンドリアに対して阻害効果が弱まっているが、結晶構造解析からこの阻害剤は Flutolanil などとは逆向きに結合していることが明らかになり、カルボニル基との水素結合がなくなり、ブタ複合体 II で形成される代替の水素結合が回虫複合体 II では形成されないことが原因と考えられる。また、置換基が-COOH (JM-181-P) のとき、両酵素で IC₅₀ が高いのは置換基の立体障害によるものであることがわかった (結晶構造解析は京都工繊大、原田教授との共同研究)。

4.2.4 リンカーの効果

アミドの部位の閉環にすることでコンフォメーションの自由度を低下させると、阻害活性は著しく低下する。この効果は特に、回虫複合体 II に対して顕著で阻害活性は 4 桁以上低下している (図 4-3)。これより、アミドの酸素原子に自由度があることが重要であると考えられる。

4.2.5 疎水性相互作用の重要性

複合体 II と Flutolanil との共結晶から、Flutolanil はキノン結合部位である疎水性ポケットに入り、トリフルオロメチル基を含む部分は親水性アミノ酸残基、イソプロポキシ基から成る右側は疎水性アミノ酸残基に囲まれていることがわかる [33] (図 4-4)。そこで、疎水性アミノ酸残基と Flutolanil の相互作用を調べた。Flutolanil

のイソプロポキシ基側の部分を単純化した化合物 (2-(trifluoromethyl)benzanilide, 2-(trifluoromethyl)benzamide, 2'-trifluoromethylacetophanone)、または、ヨード基を含む JIM-12 の同じ部分を単純化した化合物 (Benodanil, IME, N-methyl-2-iodobenzamide, 2-iodobenzamide) の IC_{50} を比較すると、短くなるほどに阻害活性は低下した。また、アミドをエステルに置換すると (Ethyl 2-(trifluoromethyl)benzoate, Methyl 2-(trifluoromethyl)benzoate, Ethyl 2-iodobenzoate, Methyl 2-iodobenzoate)、回虫複合体 II に対する阻害活性は低下するが、ブタ複合体 II に対しては上昇した (図 4-5)。これより、疎水性相互作用の形成が重要であることがわかった。

4.2.6 イソプロポキシ基の効果

疎水性相互作用の形成が重要であることがわかったので、次にイソプロポキシ基の効果調べた。回虫複合体 II に対するイソプロポキシ基の置換は自由度が高く、この部位を 6a、7a、JM-198、8 のように置換しても IC_{50} は 24.5 nM、79.4 nM、99.8 nM、330 nM となり、変化は小さい (図 4-6)。一方、ブタ複合体 II に対しては、置換基を 6a、7a、JM-198、8 のように変化させると IC_{50} は 8.61 μ M、16.2 μ M、11.6 μ M、236 μ M と 1-2 桁上昇し、回虫複合体 II に対する挙動との違いから、選択性 (SI) が変わる (図 4-6)。このことから、イソプロポキシ基の部位はブタ複合体 II に対する阻害への影響が大きいといえる。ただし、ジメチルアミノ基 (9a) では IC_{50} が回虫で 3.42 μ M、ブタで 256 μ M となり、阻害活性が極端に (4 桁) 低下するが、回虫への影響がより大きく SI の低下が顕著である (図 4-6)。この原因については結晶

構造からの明確な説明は、現段階ではできていない。

4.2.7 トリフルオロメチルベンゼンの置換 (日本農薬)

Flutolanil 誘導体、類似の市販化合物から得られた構造活性相関の情報を参考に、さらに選択性を高めるため日本農薬所有の Flutolanil の類似の化合物について検討した。Flutolanil の構造式の左側の部位であるトリフルオロメチルベンゼンを NN-1、NN-4、NN-5、NN-6、NN-7、NN-9、NN-10、NN-11、NN-12、NN-13、のように置換すると、回虫複合体 II に対する阻害効果は 90 μM で 10-20% となり、また NN-3、NN-8、NN-14 のように置換すると IC_{50} はそれぞれ、110 μM 、100 μM 、26.6 μM となり阻害効果は著しく低下した (図 4-7)。また、ブタ複合体 II に対しても阻害効果は低下した。これらより、ベンゼン環が阻害に重要であると考えられる。さらに、結晶構造からも、このベンゼン環と複合体 II とのカチオン- π 結合は阻害に重要であることがわかる [33] (図 4-4)。

4.2.8 イソプロポキシベンゼンの置換 (日本農薬)

Flutolanil の構造式の右側の部位、イソプロポキシベンゼンを NN-2、NN-15、NN-16、NN-17、NN-18、NN-18、NN-19、NN-20、NN-21、NN-22、NN-23 置換しても前述の結果と一致し、この部分の自由度は高いことがわかる (図 4-8)。特に、アミドとベンゼン環の間に炭素鎖が 1 つ増え、またイソプロポキシ基が tert-ブチル基に置換した NN-23 では回虫複合体 II に対する阻害効果は上昇し、ブタ複合体 II に対する阻害効果が低下し、SI が 20,300 倍まで上昇した (図 4-8)。Flutolanil と複

合体 II の共結晶の結果からブタ複合体 II と比較して回虫複合体 II には隙間が存在することが明らかになっており、この隙間を埋めるような化合物が特異性を高めると予想されていた [33]。NN-23 はこの結果とよく一致し、炭素鎖か tert-ブチル基もしくはその両方が特異性を高めると考えられる。

4.3 まとめ

以上の結果より、Flutolanil のトリフルオロメチル基の部位にはより電子吸引性の強い置換基、アミドの酸素原子には自由度があることが回虫複合体 II に対する阻害効果を高め、イソプロポキシベンゼンの部位が複合体 II に対する阻害に重要であることが明らかになった (図 4-9)。さらに、Flutolanil の構造式の親水性アミノ酸残基に囲まれた左側は主に阻害活性に、疎水性アミノ酸残基に囲まれた右側は特異性に関与していることが明らかになった (図 4-9)。また Flutolanil との共結晶の結果と併せて [33]、回虫複合体 II に特異的な隙間を埋める NN-23 のような化合物が予想通り特異性を高めた (図 4-9)。本研究では選択性が約 20,000 倍の化合物、NN-23 を得ることができた。今後は得られた知見と結晶構造解析の結果とを合わせて、さらに選択性の高い阻害剤を探索する予定である。

さらに、これまでは *in vitro* で阻害剤の効果を評価してきたが、今後は実際に回虫に効果があるのか *in vivo* で評価する必要がある。第一段階として、既存の駆虫薬であるピランテルパーモエート等、現在用いられている薬剤が効果を示す培養系を確立し、その後さまざまな化合物で効果を評価する予定である。また現在、

日本農薬とドイツの製薬会社との共同研究で Flutolanil に関して *in vivo* での実験が進んでおり、線虫類の幼虫に対する効果が示されている。今後は培養系で効果が確認できた化合物に関して、*H. contortus* をヒツジに感染させた系で動物実験を行ない、薬剤開発を進めていく予定である。

化合物	IC ₅₀	
	回虫	ブタ
Flutolanil	58.1 nM	45.9 μM
6a	24.5 nM	8.61 μM
7a	79.4 nM	16.2 μM
8	330 nM	236 μM
9a	3.42 μM	256 μM
JM-1-114 (insoluble)	-	-
JM-1-141a	20% at 90 μM	10% at 90 μM
JM-181-P	20% at 90 μM	0%
JM-1-141b	20% at 90 μM	5% at 90 μM
JIM-9	0%	0%
JIM-10	0%	0%
JIM-11	40.7 nM	2.85 μM
JIM-12	72.3 nM	6.43 μM
JM-198	99.8 nM	11.6 μM
JM-2-91	0%	0%
JM-2-95	0%	0%

表 4-1 合成した Flutolanil 誘導体の結果

化合物	IC ₅₀	
	回虫	ブタ
Flutolanil	58.1 nM	45.9 μM
Tecloftalam	105 μM	10% at 90 μM
Flusulfamide	76.5 μM	161 μM
Salicylanilide	1.90 μM	10% at 90 μM
Mepencil	489 nM	10% at 90 μM
Benodanil	50.0 nM	25.5 μM
2-(trifluoromethyl) benzanilide	25% at 90 μM	35.6 μM
2-(trifluoromethyl) Benzamide	109 μM	0%
2'-trifluoromethyl acetophenone	0%	0%
2-iodobenzamide	35.6 μM	0%
N-methyl-2-iodobenzamide	341 nM	10% at 90 μM
IME	335 nM	15% at 90 μM
2-aminobenzanilide	5.97 μM	0%
2-nitro-N-phenylbenzamide	72.5 nM	15% at 90 μM
3'-methoxy-3-nitrobenzanilide	7.61 μM	15% at 90 μM
Ethyl 2-(trifluoromethyl) Benzoate	77.5 μM	119 μM
Methyl 2-(trifluoromethyl) Benzoate	30% at 90 μM	15% at 90 μM
Methyl 2-iodobenzoate	71.3 μM	112 μM
Ethyl 2-iodobenzoate	31.0 μM	45.0 μM

表 4-2 市販の Flutolanil 類似化合物の結果

化合物	IC ₅₀	
	回虫	ブタ
Flutolanil	58.1 nM	45.9 μM
NN-1	15% at 90 μM	0%
NN-2	2.24 μM	0%
NN-3	100 μM	5% at 90 μM
NN-4	20% at 90 μM	10% at 90 μM
NN-5	25% at 90 μM	15% at 9 μM
NN-6	20% at 90 μM	15% at 90 μM
NN-7	25% at 90 μM	10% at 90 μM
NN-8	100 μM	5% at 90 μM
NN-9	20% at 90 μM	20% at 90 μM
NN-10	0%	5% at 9 μM
NN-11	20% at 90 μM	10% at 90 μM
NN-12	20% at 90 μM	10% at 90 μM
NN-13	20% at 9 μM	5% at 9 μM
NN-14	26.6 μM	25% at 90 μM
NN-15	143 nM	16.5 μM
NN-16	25% at 9 μM	5% at 9 μM
NN-17	6.21 μM	0%
NN-18	28.6 μM	0%
NN-19	193 nM	0%
NN-20	162 μM	0%
NN-21	947 nM	135 μM
NN-22	110 nM	32.7 μM
NN-23	5.47 nM	111 μM

表 4-3 日本農薬所有の化合物の結果

Flutolanil

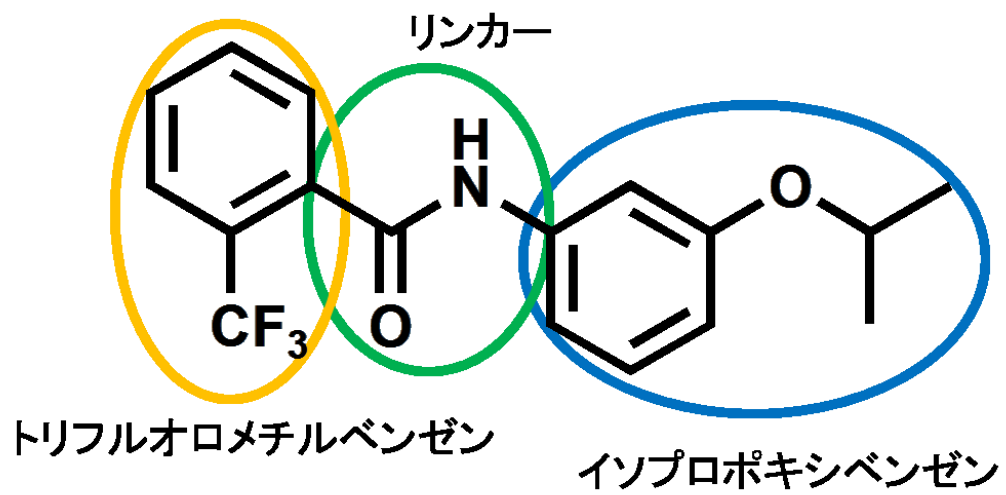
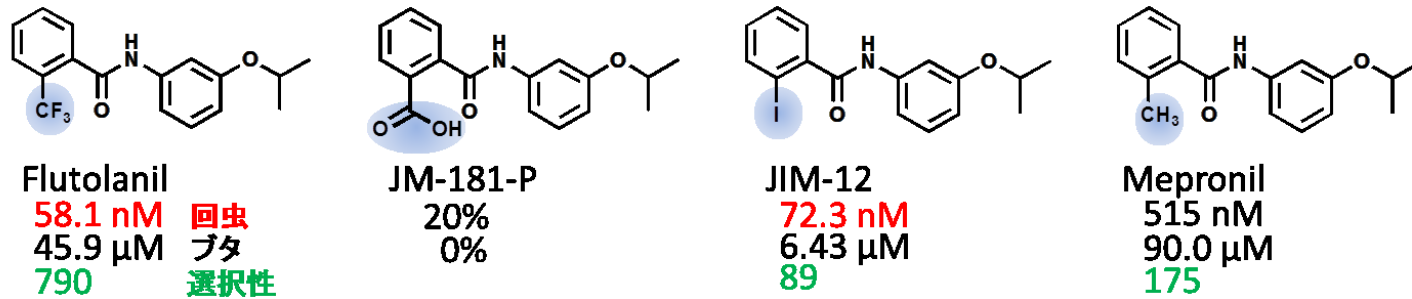


図 4-1 Flutolanil の基本構造



電子吸引性 $-\text{NO}_2 > -\text{CF}_3 > -\text{COOH} > -\text{I} > -\text{CH}_3 > -\text{OH} > -\text{NH}_2$ 電子供与性

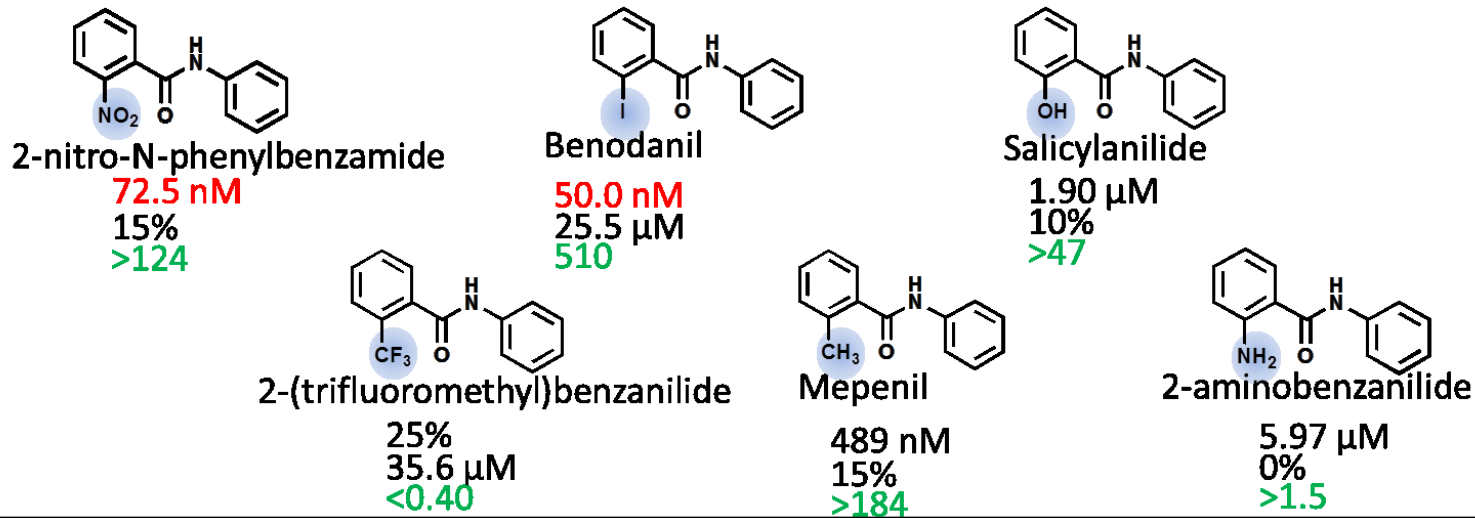


図 4-2 Flutolanil のトリフルオロ部位の置換による阻害効果

上から化合物名、回虫ミトコンドリアの IC_{50} 、ブタミトコンドリアの IC_{50} 、SI (IC_{50} ブタ/ IC_{50} 回虫)を示す。また、 IC_{50} が 100 nM 以下のものは赤字で示す。また、注目すべき構造は青で示す。

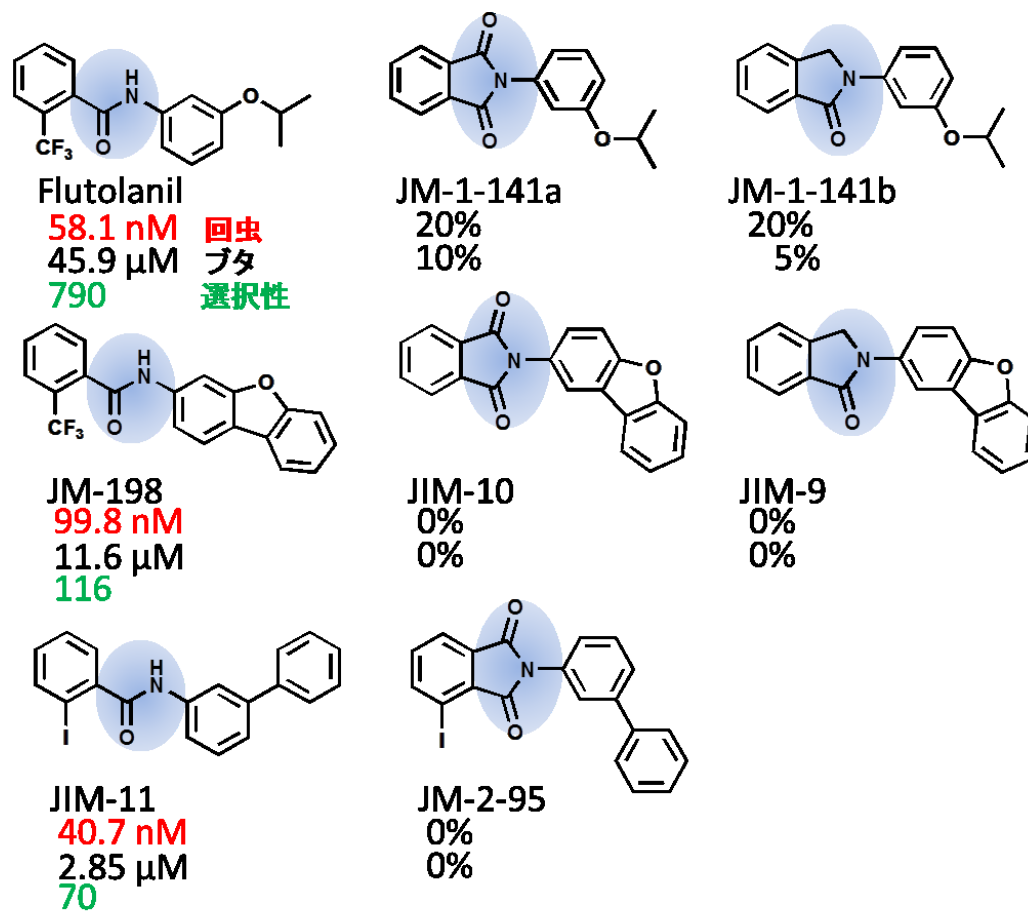


図 4-3 Flutolanil のリンカー部位の効果

上から化合物名、回虫ミトコンドリアの IC_{50} 、ブタミトコンドリアの IC_{50} 、SI (IC_{50} ブタ/ IC_{50} 回虫)を示す。また、 IC_{50} が 100 nM 以下のものは赤字で示す。また、注目すべき構造は青で示す。

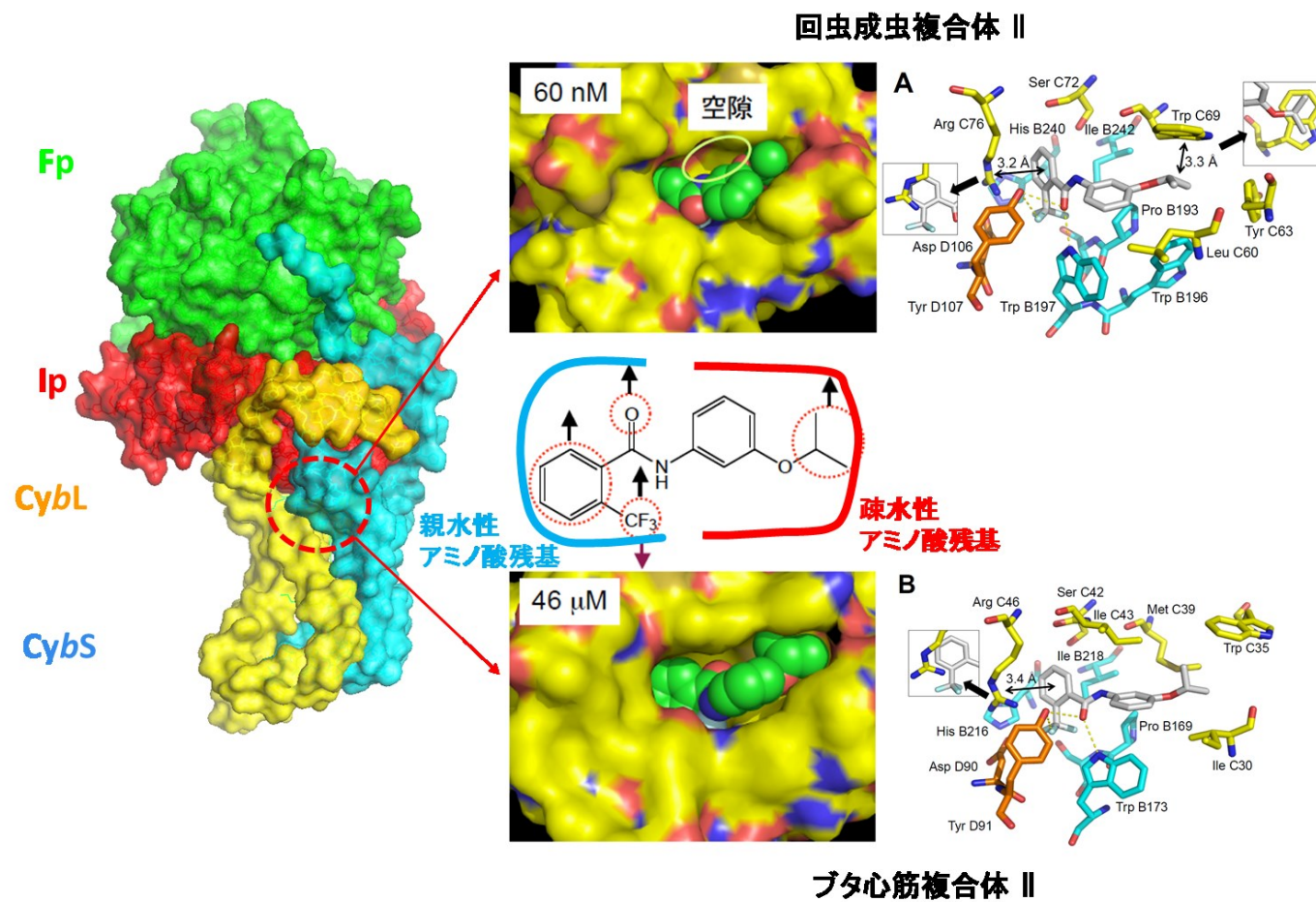


図 4-4 阻害剤の結合様式

上段に回虫複合体 II、下段にブタ心筋複合体 II との結合様式を示した。A)、B)は[32]の Fig.7 より。

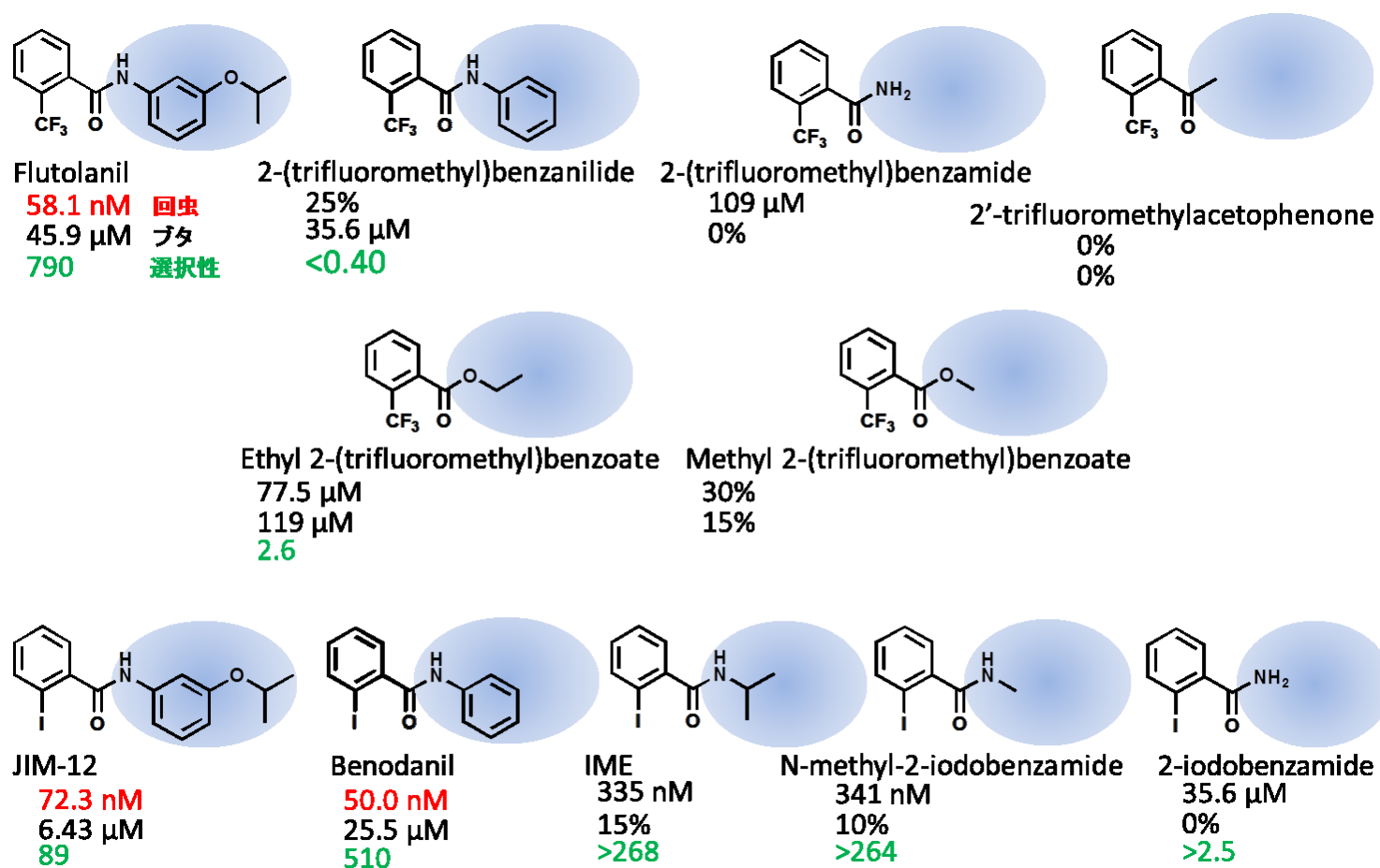


図 4-5 疎水性相互作用の重要性

上から化合物名、回虫ミトコンドリアの IC_{50} 、ブタミトコンドリアの IC_{50} 、SI (IC_{50} ブタ/ IC_{50} 回虫)を示す。また、 IC_{50} が 100 nM 以下のものは赤字で示す。また、注目すべき構造は青で示す。

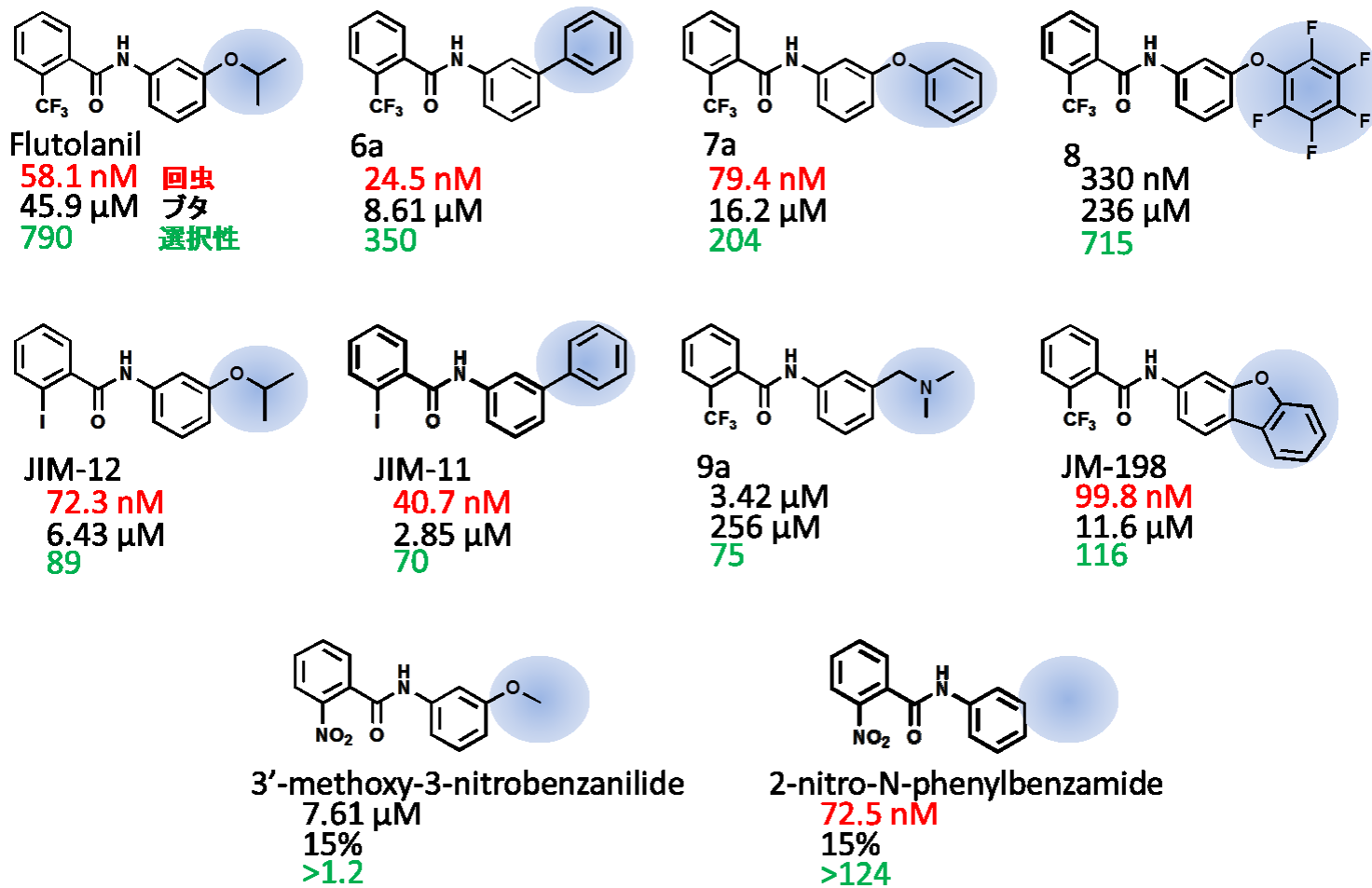


図 4-6 イソプロポキシ基の効果

上から化合物名、回虫ミトコンドリアの IC_{50} 、ブタミトコンドリアの IC_{50} 、SI (IC_{50} ブタ/ IC_{50} 回虫)を示す。また、 IC_{50} が 100 nM 以下のものは赤字で示す。また、注目すべき構造は青で示す。

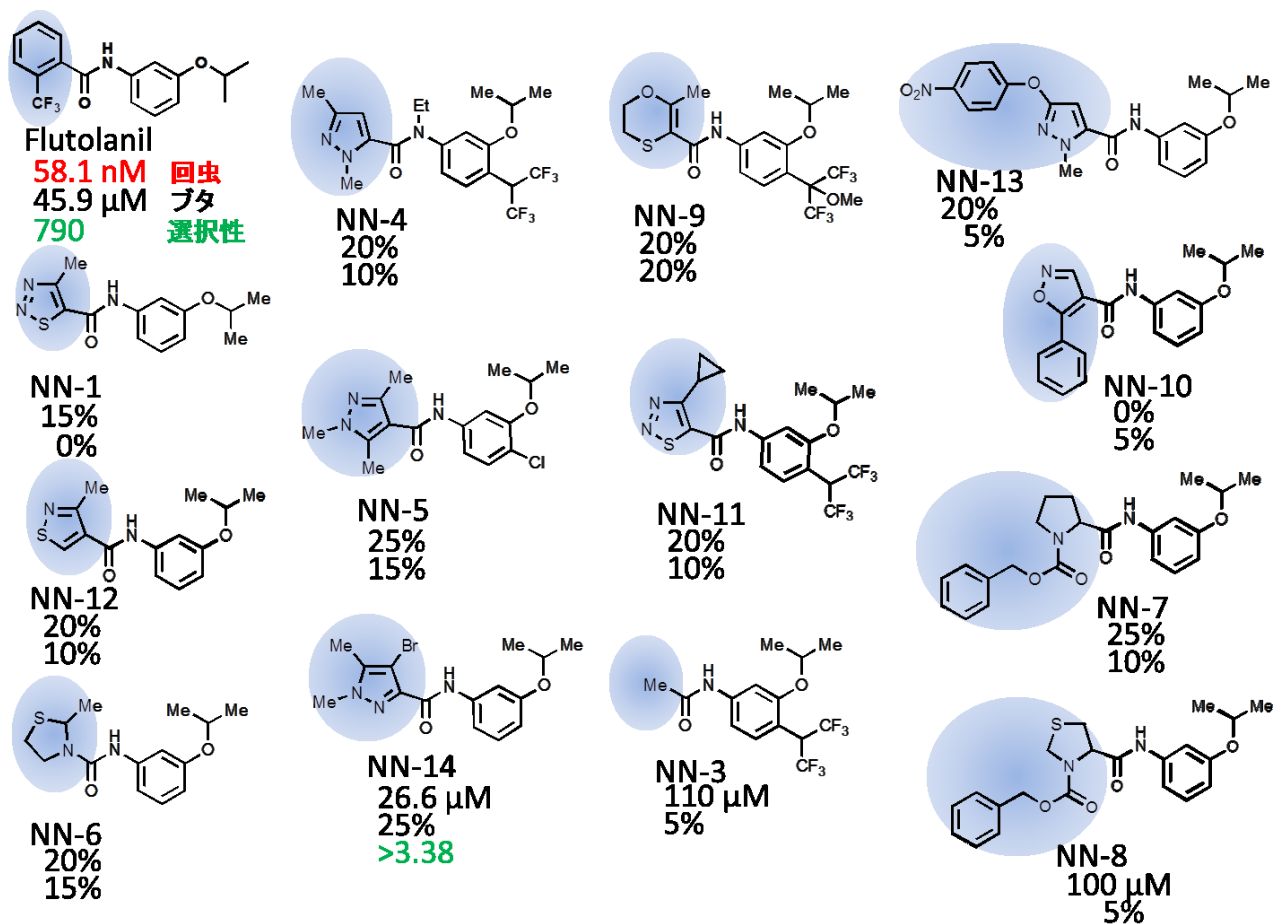


図 4-7 トリフルオロメチルベンゼンの置換

日本農薬(株)の化合物。上から化合物名、回虫ミトコンドリアの IC_{50} 、ブタミトコンドリアの IC_{50} 、SI (IC_{50} ブタ/ IC_{50} 回虫)を示す。また、 IC_{50} が 100 nM 以下のものは赤字で示す。また、注目すべき構造は青で示す。

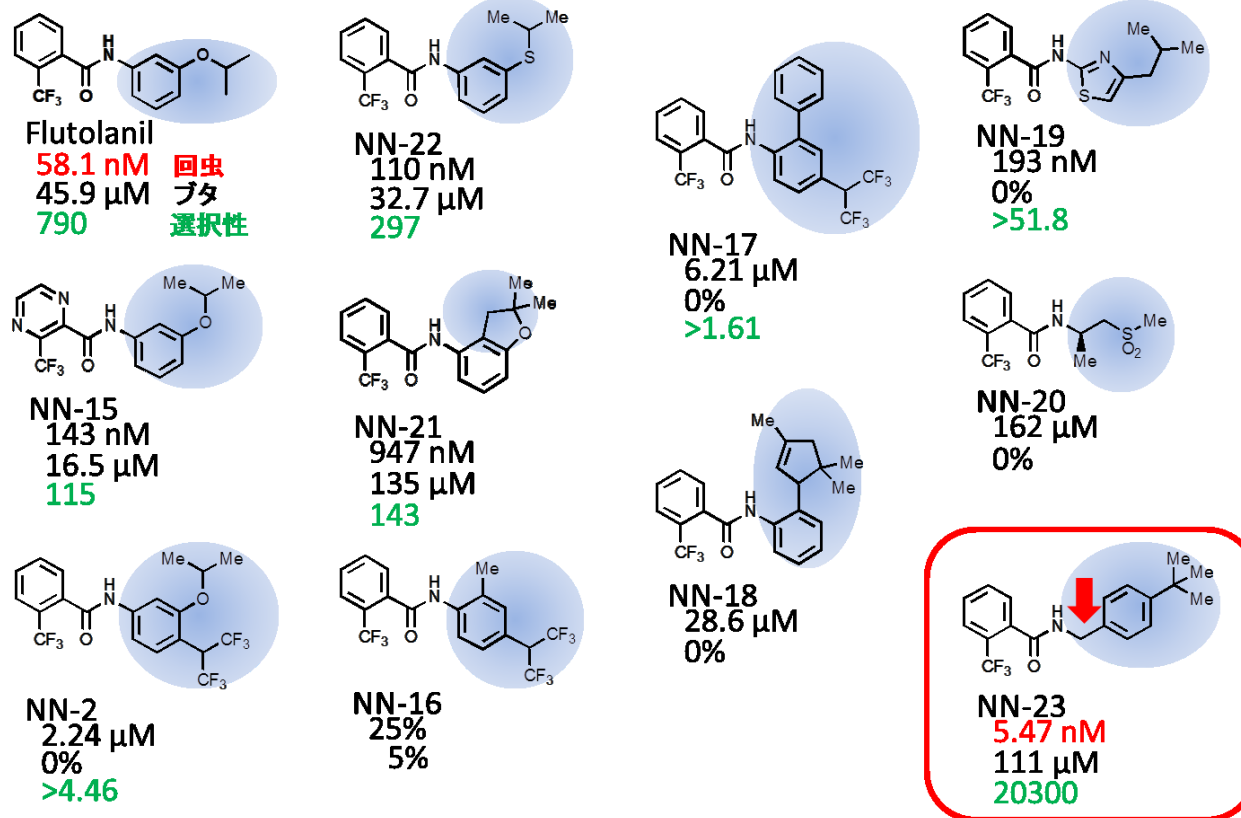


図 4-8 イソプロポキシベンゼンの置換

日本農薬(株)の化合物。上から化合物名、回虫ミトコンドリアの IC_{50} 、ブタミトコンドリアの IC_{50} 、SI (IC_{50} ブタ/ IC_{50} 回虫)を示す。また、 IC_{50} が 100 nM 以下のものは赤字で示す。また、注目すべき構造は青で示す。

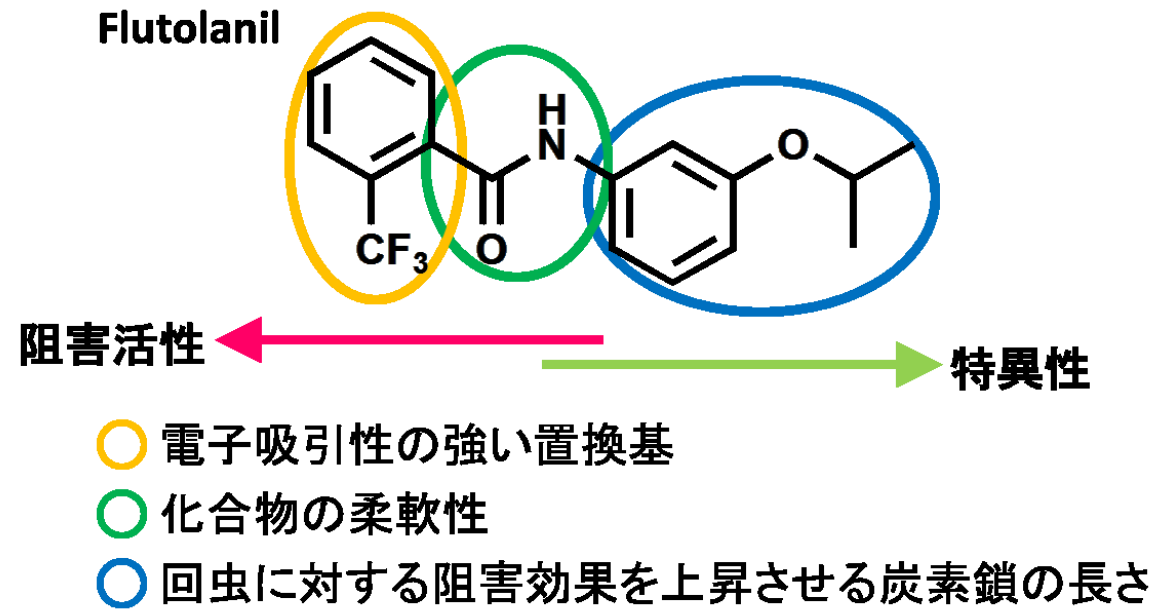


図 4-9 まとめ

第 5 章

まとめと展望

私は、ブタ回虫の宿主体内移行における環境の変化に適応したエネルギー代謝の変動を、ミトコンドリア呼吸鎖の解析により明らかにし、さらにこの情報を基盤にして宿主である哺乳類には存在しない NADH-フマル酸還元系を標的とした新規薬剤開発を目的として、特に呼吸鎖複合体 II に注目して研究を進めている。

NADH-フマル酸還元系の末端酸化酵素として重要な役割を持ち、さらに薬剤標的であるミトコンドリア呼吸鎖複合体 II について、これまでに L3、LL3、成虫において酵素学的解析、サブユニット組成の解析が行なわれてきた。エネルギー代謝系の変動と複合体 II の変動は徐々に明らかにされつつあるが、LL3 は体内移行の途中で成虫に成長するまではまだ多くの段階が残っている。この好氣的-嫌氣的エネルギー代謝系の転換を理解するため、LL3 から成虫へと成長するまでのエネルギー代謝の変化を明らかにする必要がある。さらに、各ステージにおけるミトコンドリア呼吸鎖、複合体 II の詳細な解析から、基礎生命科学に基づく抗寄生性線虫薬の開発を考えたとき、薬剤が効果を示すステージに関する重要な情報を得ることができると考えられる。そこで、本研究では環境の酸素分圧が大きくに変化する肺 (pO_2 : 13.2%) に棲息する LL3、小腸 (pO_2 : 2.5-5.0%) に到達し成虫に成長する前の段階の感染 38 日後のヤングアダルト (YA) と嫌氣的エネルギー代謝系への転換が完了している成虫を用いて複合体 II の酵素学的解析およびサブユニット組成の解析を行なった。

ブタから回収した LL3 ミトコンドリアの酵素活性は、岩田博士論文 [14] の報告同様、成虫、ウサギから回収した LL3 と比較すると最も低く、一方ウサギから回収した LL3 の QFR 活性は成虫より高い [11] という特徴はブタから回収した LL3 では見られなかった。このように、宿主が異なることで LL3 ミトコンドリアには大きな差があることが確認された。YA の NADH-フマル酸還元系を成虫と比較すると QFR、NADH-dRQ 活性は同程度の値を示し、NADH-フマル酸還元系のもう 1 つの構成因子であるキノンも YA は成虫と同様に 100%RQ であったが、これらの複合活性である NADH-FR 活性は約 1/3 倍の値となり低下していた。さらに、複合体 II のサブユニット組成の解析より YA の CybS サブユニットは成虫と同様に CybS^Aのみであった。一方 Fp サブユニットのタンパク質発現量を各ステージで比較すると、YA の Fp^Aは LL3 の 1/10 に低下しており、また YA において Fp^Lが優位に発現していることが明らかになった。しかし、mRNA 発現量を各ステージで比較すると、YA の Fp^AmRNA は成虫より高く、Fp^LmRNA は成虫と同程度の値を示し、タンパク質発現と mRNA 発現の変化は一致しなかった。これらの結果より、LL3 から YA になる間に Fp^Lのタンパク質レベルでの発現量が上昇し、YA では環境に適応するため、Fp^A合成の準備を転写レベルで開始すると考えられる。これらより YA の複合体 II は混合型複合体 II が優位に存在することが明らかになった。NADH-FR 活性が低下していたことに関して、可能性の一つとして RQ の絶対量が YA と成虫で異なることが考えられるが、分析に十分な試料の入手の点から現時点で解析は困難であり、今後の課題である。他の可能性としては、YA で優位に発現している混合型複合体 II は成虫型複合体 II と異なり複合体 I とのスーパーコンプ

レックスを形成できず NADH-フマル酸還元系において電子伝達の効率が異なることが考えられる。YA は、大きさは成虫より小さいが、体内移行を終了し成虫と同様に小腸に棲息しており、脱皮もしないと考えられている。しかしながら、本研究で明らかになったように、まだエネルギー代謝系の変化は完了していないことが示された。

これまでの研究と合わせ、回虫複合体 II の生活環におけるアイソフォームの発現、転換のタイミング、NADH-フマル酸還元系との関わりは徐々に明らかになりつつあるが、複合体 II がステージ毎に変動する理由は明らかにされていない。この解決には複合体 II 各アイソフォームの機能に関する詳細な解析が必要とされるが、回虫の各ステージから単離したミトコンドリアには複数の複合体 II アイソフォームが含まれ、それぞれの分離精製、また精製複合体 II を得るのに十分な虫の回収ができないため、成虫型、幼虫型、混合型複合体 II の好氣的、嫌氣的エネルギー代謝系における各々の役割の解析は現段階では困難である。これら複合体 II の詳細な解析のためには組換え酵素を用いた解析が必要である。しかし現段階において、真核生物のミトコンドリア呼吸鎖複合体 II の組換え酵素の発現例はなく、私たちの研究室で大腸菌の発現系などを検討してきたが活性のある酵素は得られていない。そのため、まずは *in vitro* でのタンパク質合成系を用いた複合体 II の発現系の確立が今後の課題である。

回虫はその生活環において酸素分圧変化、宿主からの臓器特異的な応答等、様々な影響を受けている。哺乳類および回虫と同じ線形動物に属する自由生活性線虫 *Caenorhabditis elegans* を含む多くの多細胞生物において、低酸素応答の多くは低

酸素誘導因子 (HIF) により制御されていることが明らかにされている。回虫にもその存在が認められており、複合体 II の変換には HIF の関与が示唆されているものの、その詳細は明らかにされてはいない [34]。さらに、小腸から取り出した成虫は、1-2 週間以上、嫌気環境下でも好気環境下でも生存することが可能であり、その NADH-FR 活性は通常の成虫と同程度の値を示し、複合体 II は成虫型であることが示されている [35]。このことから、ミトコンドリア呼吸鎖および複合体 II の変動は酸素分圧変化以外に経時的制御も考えられる。また、ミトコンドリア呼吸鎖の変動にはキノンの変動が不可欠であるが、回虫のキノン生合成経路はいまだ明らかにされていない。これら回虫ミトコンドリア呼吸鎖、複合体 II、キノンの変動の分子機構を明らかにすることで、エネルギー代謝系の低酸素適応機構の解明に重要な知見が得られると期待できる。

さらに、回虫複合体 II は哺乳類の複合体 II とは異なる機能を有しているため効果的な薬剤標的として期待され、実際に日本農薬株式会社の Flutolanil が高い選択性を持って回虫複合体 II を阻害することが明らかにされている [12] (図 1-9)。そこでさらなる選択性の向上を目指し、阻害剤の構造と阻害活性の関係についての情報を得るため、本研究では Flutolanil をリード化合物として合成された誘導体、構造の類似した市販化合物、また日本農薬所有の化合物について、回虫ミトコンドリアとブタミトコンドリアに対する阻害活性を測定した。その結果、化合物の構造活性相関、複合体 II と Flutolanil との共結晶より [33]、選択性が約 20,000 倍に向上した化合物 NN-23 が得られた。また、Flutolanil は成虫型複合体 II のキノン結合部位である Ip、CybL、CybS^A から成る疎水性ポケットに結合していることが明らか

にされている [33]。YA で発現している混合型複合体 II、成虫型複合体 II の疎水性ポケットはともに Ip、CybL、CybS^A から構成されていることから、小腸に棲息している YA および成虫ともに今回検討した化合物は有効であると考えられる。今後は、得られた構造活性相関の知見と結晶構造の知見より選択性の高い化合物の探索を行ない、また *in vivo* での回虫に対する効果の評価を行なう予定である。

最近、癌細胞におけるエネルギー代謝系のメタボローム解析により NADH-フマル酸還元系の最終産物であるコハク酸の蓄積が報告され [36]、ヒト複合体 II では Fp サブユニットのリン酸化によりフマル酸還元触媒が可能であることが示された [37]。実際、2 種のアイソフォームが存在するヒト複合体 II の一方は通常細胞で発現しているのに対し、もう一方の異なる Fp サブユニットを持つ複合体 II は癌細胞での発現が確認されている [38]。また一部の癌組織において、駆虫薬として広く用いられているフマル酸呼吸阻害剤の pyruvinium pamoate が効果を示すことから [39]、これまでバクテリアや寄生虫でしか確認されていなかった NADH-フマル酸還元系がヒトの細胞でも誘導されることが示唆された。このように臨床的な観点からもエネルギー代謝系の低酸素適応機構を解明することにより、将来的に虚血など低酸素に関連した疾患、また低栄養、低酸素環境下で増殖する癌細胞等の問題を解き明かし、またそれを標的とする薬剤の開発の上で大きなヒントとなることが期待できる。

参考文献

- [1] Komuniecki R, Komuniecki PR.
Aerobic–anaerobic transitions in energy metabolism during the development of the parasitic nematode *Ascaris suum*.
In: Boothroyd JC, Komuniecki R, editors. Molecular Approaches to Parasitology, New York: Wiley-Liss Inc; p.109-121 (1995)
- [2] Tielens AG, Rotte C, Van Hellemond JJ, Martin W.
Mitochondria as we don't know them.
Trends. Biochem. Sci., 27, 564-572 (2002)
- [3] Kita K, Takamiya S.
Electron-transfer complexes in *Ascaris* mitochondria.
Adv. Parasitol., 51, 95-131 (2002)
- [4] Kita K.
Electron-transfer complexes of mitochondria in *Ascaris suum*.
Parasitol. Today, 8, 155-159 (1992)
- [5] Amino H, Osanai A, Miyadera H, Shinjyo N, Tomitsuka E, Taka H, Mineki R, Murayama K, Takamiya S, Aoki T, Miyoshi H, Sakamoto K, Kojima S, Kita K.
Isolation and characterization of the stage-specific cytochrome *b* small subunit (CybS) of *Ascaris suum* complex II from the aerobic respiratory chain of larval mitochondria.
Mol. Biochem. Parasitol., 128, 175-186 (2003)
- [6] Amino H, Wang H, Hirawake H, Saruta F, Mizuchi D, Mineki R, Shindo N, Murayama K, Takamiya S, Aoki T, Kojima S, Kita K.
Stage-specific isoforms of *Ascaris suum* complex II: The fumarate reductase of the parasitic adult and the succinate dehydrogenase of free-living larvae share a common iron-sulfur subunit.
Mol. Biochem. Parasitol., 106, 63-76 (2000)

- [7] Douvres FW, Tromba FG, Malakatis GM.
Morphogenesis and migration of *Ascaris suum* larvae developing to fourth stage in swine.
J. Parasitol., 55, 689-712 (1969)
- [8] Kita K, Hirawake H, Miyadera H, Amino H, Takeo S.
Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*.
Biochim. Biophys. Acta, 1553, 123-139 (2002)
- [9] Omura S, Miyadera H, Ui H, Shiomi K, Yamaguchi Y, Masuma R, Nagamitsu T, Takano D, Sunazuka T, Harder A, Kölbl H, Namikoshi M, Miyoshi H, Sakamoto K, Kita K.
An anthelmintic compound, nafuredin, shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 60-62 (2001)
- [10] Hägerhäll C.
Succinate : quinone oxidoreductases. Variation on a conserved theme
Biochim. Biophys. Acta, 1320, 107-141 (1997)
- [11] Iwata F, Shinjyo N, Amino H, Sakamoto K, Islam MK, Tsuji N, Kita K.
Change of subunit composition of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone reductase/quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host.
Parasitol. Int. 57, 54-61 (2008)
- [12] Kuramochi T, Hirawake H, Somei K, Takamiya S, Furushima R, Aoki T, Komuniecki R, Kita K.
Sequence comparison between the flavoprotein subunit of the fumarate reductase (Complex II) of the anaerobic parasitic nematode, *Ascaris suum* and the succinate dehydrogenase of the aerobic, free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*
Mol. Biochem. Parasitol., 68, 177-187 (1994)

- [13] Saruta F, Kuramochi T, Nakamura K, Takamiya S, Yu Y, Aoki T, Sekimizu K, Kojima S, Kita K.
Stage-specific isoforms of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in mitochondria from the parasitic nematode, *Ascaris suum*.
J. Biol. Chem., 270, 928-932 (1995)
- [14] 岩田典子
博士学位論文, ブタ回虫の宿主体内移行におけるミトコンドリア複合体 II サブユニット組成の変化
筑波大学大学院総合科学研究科, 2007
- [15] Shimizu H, Osanai A, Sakamoto K, Inaoka DK, Shiba T, Harada S, Kita K.
Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*.
J. Biochem., 151, 589-92 (2012)
- [16] Takamiya S, Kita K, Wang H, Weinstein PP, Hiraishi A, Oya H, Aoki T.
Developmental changes in the respiratory chain of *Ascaris* mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta, 1141, 65-74 (1993)
- [17] Matsumoto J, Sakamoto K, Shinjyo N, Kido Y, Yamamoto N, Yagi K, Miyoshi H, Nonaka N, Katakura K, Kita K, Oku Y.
Anaerobic NADH-fumarate reductase system is predominant in the respiratory chain of *Echinococcus multilocularis*, providing a novel target for the chemotherapy of alveolar echinococcosis.
Antimicrob. Agents Chemother., 52, 164-170 (2008)
- [18] Miyadera H, Shiomi K, Ui H, Yamaguchi Y, Masuma R, Tomoda H, Miyoshi H, Osanai A, Kita K, Omura S.
Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase).
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100, 473-477 (2003)

- [19] Osanai A, Harada S, Sakamoto K, Shimizu H, Inaoka DK, Kita K.
Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with the specific inhibitor flutolanil.
Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun., 65, 941-944 (2009)
- [20] 新庄記子
修士論文, 回虫卵発生過程におけるミトコンドリア電子伝達系複合体 II の解析
東京大学大学院薬学系研究科, 2002
- [21] Islam MK, Miyoshi T, Yamada M, Alim MA, Huang X, Motobu M, Tsuji N.
Effect of piperazine (diethylenediamine) on the molting, proteome expression and pyrophosphatase activity of *Ascaris suum* lung-stage larvae
Acta Trop., 99, 208-217 (2006)
- [22] 大坪渉
卒業論文, 宿主体内移行におけるブタ回虫ミトコンドリア呼吸鎖の変動
東京大学医学部健康科学看護学科, 2007
- [23] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)
- [24] Tomitsuka E, Goto Y, Taniwaki M, Kita K.
Direct evidence for expression of type II flavoprotein subunit in human complex II (succinate-ubiquinone reductase).
Biochem. Biophys. Res. Commun., 311, 774-779 (2003)
- [25] Kita K, Vibat CR, Meinhardt S, Guest JR, Gennis RB.
One-step purification from *Escherichia coli* of complex II (succinate: ubiquinone oxidoreductase) associated with succinate-reducible cytochrome *b556*.
J. Biol. Chem., 264, 2672-2677 (1989)

- [26] Miyadera H, Amino H, Hiraishi A, Taka H, Murayama K, Miyoshi H, Sakamoto K, Ishii N, Hekimi S, Kita K.
Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*.
J. Biol. Chem., 276, 7713-7716 (2001)
- [27] Schagger H, Von Jagow G.
Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.
Anal. Biochem., 199, 223-231 (1991)
- [28] Wittig I, Braun H.P., Schagger H.
Blue native PAGE
Nature Protocols., 1, 418-428 (2006)
- [29] NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System
Invitrogen User Manual Version A (2006)
- [30] Wittig I, Karas M, Schagger H.
High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes.
Mol. Cell. Proteomics. 6, 1215-1225 (2007)
- [31] Schagger H, Pfeiffer K.
Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria.
EMBO J., 19, 1777-1783 (2000)
- [32] Fang J, Uchiumi T, Yagi M, Matsumoto S, Amamoto R, Takazaki S, Yamaza H, Nonaka K, Kang D.
Dihydroorotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction
Biosci. Rep., (2012)

- [33] Harada S, Inaoka D.K, Ohmori J, Kita K.
Diversity of parasite complex II
Biochim. Biophys. Acta, (2013)
- [34] Goto M, Amino H, Nakajima M, Tsuji N, Sakamoto K, Kita K.
Cloning and characterization of hypoxia-inducible factor-1 subunits from *Ascaris suum*
- the parasitic nematode highly adapted to changes of oxygen conditions during the life
cycle.
Gene, 516, 39-47 (2013)
- [35] 後藤美穂
博士論文, 寄生性線虫 *Ascaris suum* における代謝変換調節機構に関する研究
東京大学大学院医学系研究科, 2009
- [36] Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T,
Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T.
Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by
capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry
Cancer Res., 69, 4918-4925 (2009)
- [37] Tomitsuka E, Kita K, Esumi H.
Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human
complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit
Proc. Jpn. Acad., Ser. B., 85, 258-265 (2009)
- [38] Sakai C, Tomitsuka E, Esumi H, Harada S, Kita K.
Mitochondrial fumarate reductase as a target of chemotherapy: From parasites to cancer
cells.
Biochim. Biophys. Acta, 1820, 643-651 (2011).

[39] Tomitsuka E, Esumi H, Kita K.

An anticancer agent, pyrvinium pamoate inhibits the NADH-fumarate reductase system
– a unique mitochondrial energy metabolism in tumour microenvironments.

J. Biochem., 152, 171-183 (2012)

謝辞

本研究を行なうにあたり、その機会を与えてくださり、ご指導いただきました東京大学大学院医学系研究科、生物医化学教室 北潔教授に心より感謝いたします。

常に数々の有益な助言を下さり、丁寧にご指導くださいました弘前大学大学院農学生命科学研究科、分子生命科学 坂元君年博士、東京大学大学院医学系研究科、生物医化学教室 網野比佐子博士、後藤美穂博士に深く感謝いたします。

ブタ回虫 LL3、YA の回収にあたりご尽力くださり、解析に際して助言をくださいました独立法人農業・食品産業技術総合研究機構、動物衛生研究所 寄生虫グループの辻尚利博士、M. Khyrul Islam 博士、三好猛晴博士、八田岳士博士、Abdul Alim 氏はじめ、研究所の皆様に感謝いたします。

ブタ回虫成虫の収集にご協力いただきました、東京中央食肉卸売市場の片岡信一氏に深く感謝いたします。

阻害剤の研究を行なうにあたり、貴重なご意見を下さり、結晶構造解析を行って下さいました京都工業繊維大学大学院工芸科学研究科、応用生物学部門 原田繁春教授、化合物の合成をして下さいました東京大学大学院薬学系研究科、有機反応化学教室 井上将行教授、松岡茂博士はじめターゲットタンパクプロジェクトの皆様、貴重なご意見を下さり、化合物を提供して下さいました日本農薬株式会社の皆様に感謝いたします。

研究の基礎を丁寧にご指導くださり、本研究科へ快く送り出してくださいました
立教大学理学部、生命理学科 松山伸一教授に深く感謝いたします。

最後に、日々ご指導いただき有益なご助言をくださいました東京大学大学院医学
系研究科、生物医化学教室の皆様にご挨拶いたします。