

Title	Expression and characterization of recombinant pyruvate kinase from <i>Toxoplasma gondii</i> tachyzoites
Sub Title	トキソプラズマ急増虫体の遺伝子組換えピルビン酸キナーゼの発現と解析
Author	前田, 卓哉(Maeda, Takuya)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.30-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0030">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0030</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

# Expression and characterization of recombinant pyruvate kinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoites

(トキソプラズマ急増虫体の遺伝子組換えピルビン酸キナーゼの発現と解析)

前 田 卓 哉

## 内容の要旨

トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) の急増虫体 (tachyzoite) はエネルギー源を主に解糖系に依存していると考えられているが、その活性調節機構を含めた詳細については、未だ体系的には理解されていない。特に解糖系の律速酵素として知られるヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼおよびピルビン酸キナーゼのうち、ヘキソキナーゼおよびホスホフルクトキナーゼは非調節酵素として存在していることが既に報告されている。一方、原虫の粗抽出酵素を用いた検討では、ピルビン酸キナーゼがアロステリック酵素として存在し、解糖系の調節酵素として重要な役割を果たしていることが報告されているが、実際の調節メカニズムについては不明な点が多く残されている。今回、トキソプラズマのピルビン酸キナーゼ遺伝子をクローニングし、組換え酵素を作製して、その酵素学的性質と解糖系における役割について検討を加えた。

はじめに、ESTのデータベースをもとに、*T.gondii* cDNAライブラリーから全長2,207塩基のピルビン酸キナーゼの遺伝子をクローニングし、組換え酵素を作製した。酵素学的性状としては、①至適pHを7.0近傍にもち、②活性にはカリウムイオンが必須であり、2価の陽イオン、特にマンガンによって著明に活性化を受けた。さらに③基質であるホスホエノールピルビン酸に対してはアロステリックに作用する一方、従来から活性化物質として知られるフルクトース1,6-ビスリン酸によっては影響を受けず、ヘキソキナーゼの反応生成物であるグルコース6-リン酸の存在下においてのみ酵素は特異的に活性化された。さらに、この特徴的な性質は酵素のアミノ酸配列にも反映しており、酵素の活性部位を含む領域では種を超えて非常によく配列が保存されていたが、フルクトース1,6-ビスリン酸などのリガンドが結合する活性調整領域の相同性は低く、トキソプラズマでは極めて特異なアミノ酸配列を有していた。

トキソプラズマではホスホフルクトキナーゼが非調節酵素であり、第一の律速酵素として知られるヘキソキナーゼは、反応生成物であるグルコース6-リン酸によってフィードバック阻害を受けないが、活性が低く律速酵素として機能することが報告されている。そのうえ、グルコース6-リン酸によってピルビン酸キナーゼが活性調節を受けており、グルコース6-リン酸を介するヘキソキナーゼ-ピルビン酸キナーゼの系が、解糖系の流れを調節する重要な役割を果たしていることが示唆された。この特徴的なメカニズムについては、トキソプラズマの細胞内寄生現象と関連するかどうか、その生物学的意義については今後の検討が必要である。

## 論文審査の要旨

細胞内寄生原虫であるトキソプラズマは、そのエネルギー産生の多くを解糖系に依存しているが、未だ解糖系の調節のメカニズムについての詳細な検討は行われていない。本研究は、多くの細胞で解糖系の律速酵素の一つであるピルビン酸キナーゼについて、その重要性に鑑み、トキソプラズマ急増虫体 (tachyzoite) から遺伝子をクローニングし、組換え蛋白を作製して、その酵素学的解析を試みたものである。解析の結果、トキソプラズマの酵素はグルコース6-リン酸による活性調節を受けるという極めて特異な性質を明らかにした。またこの所見に基づいて、グルコース6-リン酸結合部とおもわれる部分のアミノ酸配列について詳細に検討を加えた。審査では組換えピルビン酸キナーゼが四量体を形成することについて、その解析方法の詳細が問われ、組換え蛋白とnativeの蛋白について、ゲルろ過法とSDS-PAGE法を行ない、四量体を形成すると推定した旨が回答されたが、さらに超遠心法等を併用してより詳細に分子量を検討する必要があること、さらに、どのような結合様式で四量体を形成するのかも併せて検討する必要があることが指摘された。また、細胞内において、ピルビン酸キナーゼが糖付加などの修飾を受ける可能性について質問がなされ、組換え蛋白とnativeの蛋白について分子量に差がみられないことから、糖付加などの修飾を受けていないと考えて矛盾しない旨が回答された。さらに、二価の陽イオンによる酵素の活性化効果に関連し、酵素蛋白にintrinsicに結合している可能性のある金属イオンの有無、酵素反応系でのイオン濃度の調整方法の詳細が問われ、組換え蛋白を予めEDTAにてキレート処理後、陽イオンが添加された旨が回答された。また、組換え蛋白の至適pHについても質問がなされ、pH7.0近傍で最も高い活性が得られ、酸性側では比較的低いpHまで活性が得られる一方、アルカリ性側では、pHが8.0を超えると急速に活性が低下する事が答えられた。さらに、解糖系のバイパス経路であるペントースリン酸回路について、その系の存在と活性調節メカニズムについては、グルコース6-リン酸の解糖系における役割について解析する上で非常に重要であり、さらに、宿主と異なる性質をもつこのピルビン酸キナーゼが、抗トキソプラズマ薬の開発ターゲットになりうるかどうかを検討する上でも、今後検討すべき課題であるとの指摘がなされた。

以上、本研究は、グルコース6-リン酸による活性調節の生理的意義の解明など、今後更に検討を継続する余地を残しているものの、トキソプラズマにおける解糖系の律速酵素の一つであるピルビン酸キナーゼの解析を組換え蛋白を用いて行ない、従来の報告にはない新たな活性調節メカニズムを明らかにしたものであり、原虫感染症研究の上で有意義な研究と評価された。

論文審査担当者 主査 熱帯医学・寄生虫学 竹内 勤  
微生物学・免疫学 小安 重夫 病理学 岡田 保典  
医化学 末松 誠

学力確認担当者：

審査委員長：小安 重夫

試問日：平成16年2月12日