

腸管寄生原虫赤痢アメーバの病原機構の解明

研究課題名：プロテオーム解析による赤痢アメーバの病原機構の解明

国立感染症研究所寄生動物部 室長
野崎 智義

● 研究のねらい

嫌気性原虫赤痢アメーバはヒトの大腸に寄生し、複数の病原因子を細胞外に放出して免疫細胞を融解したり、感染局所の組織破壊を起こすとともに、破壊された細胞・組織を活発に貪食（ファゴサイトーシス）・除去して寄生を成立させる。病原因子の分泌や貪食は赤痢アメーバの寄生に不可欠であり、その分子機構を解明することは、赤痢アメーバの病原機構を理解するために不可欠である。我々は分泌や貪食を調節する細胞機構としての小胞輸送に注目し、赤痢アメーバの小胞輸送の特殊性を分子レベルで明らかにすることにより、赤痢アメーバの小胞輸送が病原機構にどう関与するかを解明することを目指した。

● 研究結果と考察

1. プロテオーム解析によるファゴソームタンパク質の網羅的同定

貪食過程に関わる分子を網羅的に同定することを目的として、貪食胞（ファゴソーム）を分離・精製し、ファゴソームに存在するタンパク質をプロテオーム解析により同定した。これによりファゴソームの形成、成熟の過程でファゴソームに動員される160を超えるタンパク質とそれぞれのタンパク質の動態を明らかにした（Okada論文投稿中）。赤痢アメーバに特異的な細胞表面レクチン、システインプロテアーゼ(CP)を含む様々な加水分解酵素、Rabタンパク質などが同定された。約40%のタンパク質はいかなる既知のタンパク質とも有意な同一性をもたない新規タンパク質であり、赤痢アメーバ特異的なファゴソーム成熟機構が示唆された。また、これまで細胞表面やミトコンドリアに存在すると予測されていたタンパク質がファゴソームに構成的に見られた。以上の結果をもとに赤痢アメーバのバーチャルファゴソームを構築することができ（図1）、赤痢アメーバのファゴソーム形成・成熟に関与するタンパク質群の全体像とその詳細な動態が解明された。同時に、赤痢アメーバのファゴソーム成熟過程の特殊性の一端が分子レベルで明らかになった。

2. 赤痢アメーバの貪食におけるRabタンパク質の役割の解明

低分子量GTPase Rabタンパク質は特定の小胞間の特異的な結合と融合(docking/fusion)に機能する重要なタンパク質である。我々は貪食の際に機能する数種類のRabタンパク質の特異的な役割を明らかにした。赤痢アメーバがほ乳動物の赤血球に接着すると、貪食が開始する前に、ファゴソームと独立した2-3mmの空胞(prephagosomal vacuole, PPV)が形成された。この空胞の形成には少なくともRab5とRab7A 2種類のRabが関与していた。Rab5はPPV形成に、Rab7AはPPVの形成とPPVを介するリソソーム分解酵素のファゴソームへの輸送に機能していた。PPVは他種生物に見られないユニークなオルガネラであり、リソソーム由来の分解タンパク質であるCPやアメーバポア(AP)などを活性化し貯蔵する準備空胞であると予想された（図2）。

更にRab7Aの機能を調節するタンパク質としてRab7A結合タンパク質を生化学的精製により単離したところ、他種生物でレトロマー(retromer)と呼ばれている複合体と似た構造を示す複合体を獲得した。赤痢アメーバのレトロマー様複合体は赤痢アメーバRab7Aと特異的に結合し、リソソーム酵素の輸送をネガティブに制御していた（図2）。複合体との結合を介したRab7Aの調節機構は他種生物と異なった前例のない制御機構であった。

赤痢アメーバの小胞輸送の特殊性として、Rabの高度の多様性が挙げられる。一般に酵母などの単細胞生物では7-11種、多細胞生物のハエ、線虫、植物、ヒトでも29-57種のRabが存在するに過ぎないのに対して、単細胞生物である赤痢アメーバは少なくとも90種のRabタンパク質を有する。赤痢アメーバのRabの多様性を示す1つの例としてヒトでは存在しないRab7のアイソタイプの存在があげれる。赤痢アメーバでは少なくとも8種類のRab7アイソタイプが存在する。我々は上記Rab7Aに続いてRab7B, Rab7Dの貪食の小胞輸送における役割を明らかにした（図2）。これらの一連の成果により赤痢アメーバの貪食におけるRab7アイソタイプの貪食における特異的な役割が明確になった。

3. 赤痢アメーバにおける貪食過程の可視化

貪食におけるファゴソームの成熟過程をリアルタイムで追跡するシステムを構築した。赤痢アメーバのファゴソーム内腔はファゴソームの形成後2分以内にpH4.5まで低下し、少なくとも数時間酸性化されたまま維持された。また、貪食胞における緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現した酵母やリーシュマニア原虫の分解も半減期10分以内であり、効率的な酸性化と分解が急速に起こっていることが明らかになった。病原性の効率の異なる複数の赤痢アメーバ株と非病原性関連種である*E. dispar*を用いてファゴソームの酸性化と分解の比較を行った。ファゴソームの酸性化の効率とファゴソームでのGFP分解は良く相関していたが、酸性化・分解の効率は必ずしも見かけの病原性と相関していなかった。以上のことはファゴソームの酸性化が分解機構と密接に相関していることを示していると同時に、ファゴソームの酸性化・分解・成熟の効率だけが赤痢アメーバ原虫の病原性を規定しているのではなく、分解酵素の細胞内での分別輸送・分泌の調節がより密接に病原性に関与していることが予想された。

● 今後の展望

本研究で明らかになった貪食における赤痢アメーバ特異的分子機構のうち、どの経路または分子が病原性と最も高く相関しているかを明らかにしたい。そこでファゴソーム成熟過程で病原性株・非病原性分離株間、及び赤痢アメーバ・非病原性アメーバ間で明瞭な量・動態の差異の見られるファゴソームタンパク質を中心にしてその機能を逆遺伝学的手法を用いて解明するとともに、病原機構におけるそれぞれの分子の役割を明らかにする予定である。更に、赤痢アメーバ全遺伝子を網羅したDNAマイクロアレイを作製し、病原性に強く相関する小胞輸送、或いはそれ以外の経路に関与する遺伝子を網羅的に同定する予定である。

プロテオーム解析によるバーチャルファゴソーム

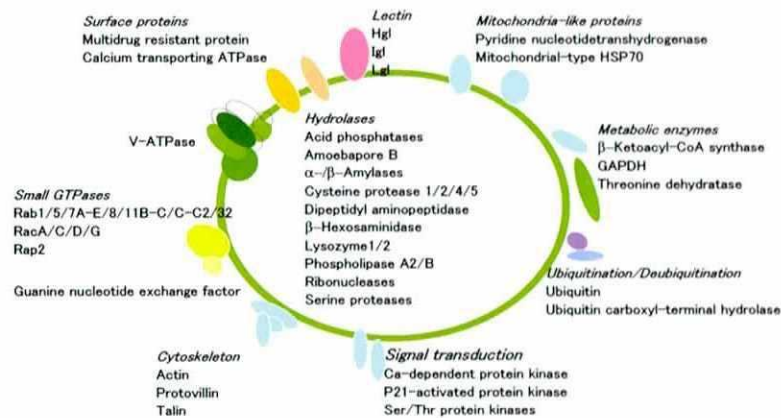


図1 プロテオーム解析によるバーチャルファゴソーム

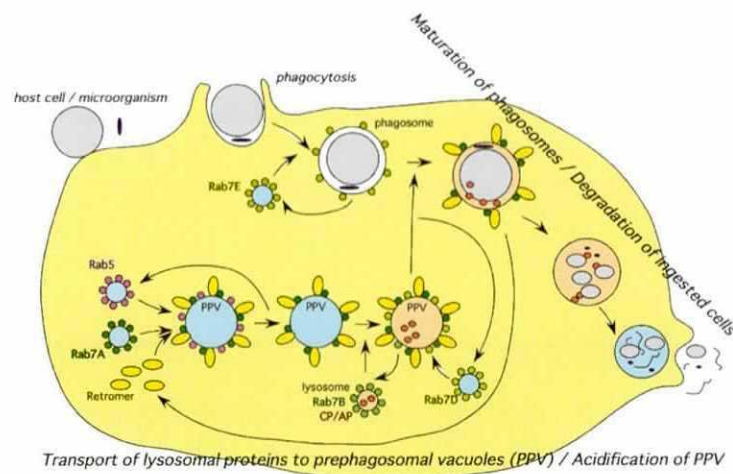


図2 赤痢アメーバにおけるファゴソームの形成と成熟過程

主要業績リスト

1. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) Remarkble genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4081-90.
2. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., and Nozaki, T. (2003) Geograhic diversity of genotypes among *Entamoeba histolytica* field isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3748-3756.
3. Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Nozaki, T., Takeuchi, T., and Matsubara, C. (2003) Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp. Isolates. *Parasitol. Int.* 52, 169-173.
4. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydrogenase from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 375, 729-736.
5. Tokoro, M., Kobayashi, S., Takecuhi, T., and Nozaki, T. (2003) A novel sulfur-containing amino acid degradation enzyme methionine γ -lyase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 278, 42717-42727
6. Ghosh, S., Chan, J., Lea, C.R., Meints, G.A., Lewis, J.C., Tovian, Z., Flessner, R., Loftus, T.C., Bruchhaus, I., Fradley, K.L., Kendrick, H., Croft, S., Kemp, R., Kobayashi, S., Nozaki, T., and Oldfield, E. (2004) Effects of Bisphosphonates on the Growth of *Entamoeba* and *Plasmodium* species *in vitro* and *in vivo*. *J. Med. Chem.* 47, 175-187.
7. Kumagai, M., Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 2316-2323.
8. Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Nozaki, T. (2004) An intestinal parasitic protist *Entamoeba histolytica* possesses a non-redundant NIF-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* 279, 16863-16874.
9. Ali, V., Shigeta, Y., Hashimoto, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular and biochemical characterization of D-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*: a unique enteric protozoan parasite that possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Eur. J. Biochem.* 271, 2670-2681.
10. Saito-Nakano, Y., Yasuda, and Nozaki, T. (2004) Unique role of Rab5 and Rab7 in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 49497-49507.