様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ５ 月 １８ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｈ０２６５０

研究課題名（和文）赤痢アメーバのトロゴサイトーシスの分子基盤の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanism of trogocytosis in Entamoeba histolytica

研究代表者
野崎　智義（Nozaki, Tomoyoshi）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・教授

研究者番号：６０１９８５８８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,200,000円

研究成果の概要（和文）：一般に言われる貪食の形態には、通常の「丸呑み」に近い死細胞を取り込む貪食と近年その存在が示されつつある咀嚼食が存在する。本研究ではヒトの大腸に寄生する赤痢アメーバにおける咀嚼食の分子基盤を明らかにする研究を行った。赤痢アメーバが生きた細胞を補足する過程で機能するシアル酸結合細胞表面受容体の候補を同定した。また、咀嚼食に関与するフォスファチジルイノシトール(PI)シグナリングに関与するキナーゼとフォスファターゼをゲノムから同定し、そのうちPI(3,4,5)P3の脱リン酸化に関与するPTENが咀嚼食に関与することを明らかにした。また、PIリン酸の細胞内輸送に関与する脂質輸送タンパク質を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
赤痢アメーバによる腸炎・赤痢は海外では年間に世界人口の約1%が感染するとされている重要な感染症である。日本国内でも年間1000例を超える届け出のある最多の寄生虫症である。赤痢アメーバの病原機構の中心を占める咀嚼食に直接関与する分子を同定し、その詳細な働き方を理解することにより、今後赤痢アメーバの起こす病気の理解が進むと同時に、新しい治療法や予防法を作り出すことが出来る可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Engulfment is categorized into two modes: phagocytosis and trogocytosis. The objective of this study was to elucidate molecular mechanisms involved in trogocytosis in the enteric protozoan parasite Entamoeba histoltyica. The putative parasite's receptor for the attachment of the target human cells was identified. A phosphatase that catalyzes phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphates was found to be involved in the regulation of trogycytosis. In addition, a lipid transfer protein involved in the transport of phosphatidylinositol phosphates was identified.

研究分野：寄生虫学、感染症学、病原学

キーワード：赤痢アメーバ　腸炎　貪食　病原機構　受容体　キナーゼ　フォスファターゼ　脂質輸送

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

貪食(ファゴサイトーシス)は原虫からヒトに至るまで広く保存されたユビキタスな細胞機能である。宿主の自然免疫において、好中球が病原体を不活化したり、獲得免疫においてマクロファージ・樹状細胞等抗原提示細胞が病原体を補足するのに不可欠である。一方、赤痢アメーバ・自由生活性アメーバ等の寄生原虫においては、貪食は免疫から回避し寄生局所を形成するために、更に栄養摂取に不可欠である。貪食の基盤となる分子機構はヒトや原虫において深く研究されている。近年、貪食の中に、一般に考えられている「無差別な」取り込みでなく、選択的な取り込みがあることがヒト T 細胞や赤痢アメーバの研究により明らかになってきた。細胞を無差別に丸のまま取り込む通常の貪食と異なり、生細胞のみを選択的にしかも摘まみ食い(=chew, bite, nibble)するように少しずつ部分的に取り込むトロゴサイトーシス(咀嚼食)と呼ばれる現象である。咀嚼食は、T 細胞が抗原提示細胞の膜上抗原提示受容体を部分的に摘まみ食いする現象や病原細菌のヒトマクロファージ間伝播、好中球やマクロファージによる癌細胞除去など多様な機能に関与することが示されている。一方、病原体側でも、赤痢アメーバがヒト生細胞のみを咀嚼食することが示され、咀嚼食は宿主側においても、寄生原虫側においても重要かつ多様な役割を有する生物機能であることが示され始めていた。

２．研究の目的

貪食・咀嚼食は真核生物に幅広く保存された生物現象であり、すべてのスーパーグループで記載されている。多様な生物での保存性・進化的由来・分子機構の理解は一般生物学的にも重要である。それにも関わらず、貪食・咀嚼食の詳細な分子論的相違や両者の機構を区別する分子はほとんど未解明である。本研究の目的は、咀嚼食の分子過程をより詳細に解析し、その生物学的・生理学的意義を解明することである。具体的目的を以下の様に設定した。１．咀嚼食が発動される必須条件として赤痢アメーバのヒト生細胞への接着がある。接着に伴い誘起される咀嚼食キナーゼ AGCK1 の上流の分子機構を解明するために、AGCK1 の動員を決定する上流のシグナル実行分子(受容体)とヒト側のリガンドを生化学的方法により同定することを目指す。咀嚼食の決定分子 AGCK1 はフォスファチジルイノシトール(PI)-(3,4,5)3 リン酸(以下 PIP3)結合タンパク質である。従って細胞膜上、特に接着局所や咀嚼食に関わる構造体(トンネル様構造)における PI3P を含むフォスファチジルイノシトールリン酸(PIP)の産生・分解調節機構の理解は極めて重要である。そこで咀嚼食において PIP3 の合成に関与するキナーゼ・フォスファターゼのうち代表的なタンパク質の機能解析を行う。また、貪食・咀嚼食において機能する PIP をオルガネラ間で輸送する PIP 輸送タンパク質(PITP)の咀嚼食における関与を検討するために、PITP の同定・解析を行うことを目的とする。

３．研究の方法

1．咀嚼食の上流シグナル実行分子の同定

咀嚼食はヒト生細胞に接触した場合だけに惹起され、死細胞・細菌・人為的粒子に接触した際には誘導されない。新鮮なヒト赤血球は咀嚼食で、酸化等で劣化した赤血球は貪食で取り込まれることが準備結果で明らかになっており、両者の相違として同定された表面のシアル酸の有無を利用して、シアル酸結合ビーズを用いて、赤痢アメーバのシアル酸結合タンパク質をアフィニティ精製、質量分析により網羅的に同定する。同定されたタンパク質はヒト生細胞の細胞膜表面に選択的に発現し咀嚼食効率と相関する候補分子を特定し、CRISPER-Cas9・RNA 干渉法で発現抑制

株を作成、仮説を検証する。
2．咀嚼食を調節する PI 代謝酵素・輸送タンパク質の同定
PIP3 の合成には PI3 キナーゼが関与することが他種生物で示され、赤痢アメーバのゲノム中に存在する 6 種類の Class I PI3K または Vps34(Class III PI3K)のどれかにより PI-(3,4)P2 から合成され、23 種のフォスファターゼのうちいずれかにより分解されると予想される。これらのうちこれまでの貪食胞プロテオームで我々が同定した 3 種のキナーゼ、8 種のフォスファターゼの細胞内局在を、PI3P, PIP3 と同時にライブイメージングにより確認する。また大腸菌の組換え酵素を作成し、基質特異性を決定する。更にキナーゼ活性に必須なアミノ酸残基の置換変異体の導入により貪食・咀嚼食の効率・速度の遅延が起こるかを検証する。
3．咀嚼食に関与する脂質輸送タンパク質の解析
ゲノム中にある 15 種類の STAR ドメインを有する PI 輸送タンパク質(PITP)のうち発現量の多い 3 種の標識発現体と gene silencing 法による発現抑制株を作成し、ライブイメージングにより咀嚼食への関与を検証する。

４．研究成果
(1) 咀嚼食の上流シグナル分子の同定
赤血球を老化・酸化ストレス暴露・ノイラミニダーゼまたはトリプシン処理することにより、貪食・咀嚼食を制御する条件を確立した。赤血球表面のシアル酸が咀嚼食を誘導するリガンドであることが予測された。そこで赤痢アメーバ膜画分抽出液からシアル酸付加ビーズを用いてシアル酸結合タンパク質を分離・精製・質量分析解析した。Sec24, Vps35, Coatmer beta subunit, UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase, Galactose/N-acetylgalactosamine-inhibitable surface lectin heavy subunit(Hgl)を始めとする多くのタンパク質が同定された。その中で細胞表面受容体の可能性のある Hgl の新規アイソタイプに関してエピトープ付加赤痢アメーバ形質転換体を作製し細胞内局在を確認した。細胞内の小胞体や膜構造への局在が観察された。細胞膜への局在は観察されなかった。
(2) 咀嚼食を調節する PI 代謝酵素・輸送タンパク質の同定
咀嚼食において PIP3 の合成に関与するキナーゼ・フォスファターゼを同定し、その貪食・咀嚼食における役割を解明するための研究を行った。ゲノムから 11 種の PI-kinase と 23 種の PI-phosphatase を同定した。Class I PI3K, Myotubularin, Type II PI 5-phosphatase の特徴的な遺伝子重複と多様化が特徴的に見られた。その中から、膜結合ドメインの有無、mRNA 発現量、重複性などの情報から、5 種の遺伝子(Class I PI3K; Class III PI3K; PTEN; Type II PI 5-phosphatase; Sac)の組換えタンパク質の作成を行った。このうち PIP3 の分解に関与する PTEN の一つが咀嚼食と貪食に関与することを明らかにした。
(3) 咀嚼食に関与する脂質輸送タンパク質の解析
ゲノム中に存在する>10 種以上のアイソタイプの中から、PI3P と PI(3,4)P2 の輸送に関与する STAR ドメインを有する脂質輸送タンパク質を同定した。タンパク質の発現抑制体・過剰発現体の解析により、インビトロでの咀嚼食、組織障害性に関与するとともに、細胞接着などの別の細胞機能にも関与することを明らかにした。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計12件（うち査読付論文　12件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　12件）

１．著者名 Das, K., Watanabe, N., and Nozaki, T.	４．巻 17(4)
２．論文標題 Two StAR-related lipid transfer proteins play specific roles in endocytosis, exocytosis, and motility in the parasitic protist Entamoeba histolytica.	５．発行年 2021年
３．雑誌名 PLoS Pathogens	６．最初と最後の頁 e1009551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/ journal.ppat.1009551	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T.	４．巻 83(2021)
２．論文標題 Diversity of phosphoinositide binding proteins in Entamoeba histolytica.	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Parasitol International	６．最初と最後の頁 102367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/.parint.2021.102367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Saito-Nakano, Y., Wahyuni, R., Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., Mitra, B. N., Nozaki, T.	４．巻 23
２．論文標題 Rab7D small GTPase is involved in phago-, trogocytosis and cytoskeletal reorganization in the enteric protozoan Entamoeba histolytica.	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Cell. Microbiol.	６．最初と最後の頁 e13267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.13267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Santos, H. J., Chiba, Y., Makiuchi, T., Arakawa, S., Murakami, Y., Tomii, K., Imai, K., Nozaki, T.	４．巻 8
２．論文標題 Import of Entamoeba histolytica mitosomal ATP sulfurylase relies on internal targeting sequences. Special Issue “Virulence and Parasitism of Parasitic Protozoa”	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Microorganisms	６．最初と最後の頁 1229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8081229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Nakada-Tsukui, K. #, Marumo, K, and Nozaki, T.# (# correspondence)	4．巻 239
2．論文標題 A lysosomal hydrolase receptor, CPBF2, is associated with motility and invasion of the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Mol. Biochem. Parasitol.	6．最初と最後の頁 111299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molbiopara.2020.111299.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., Maehama, T., and Nozaki, T.	4．巻 8(7)
2．論文標題 Dynamism of PI4-phosphate during interaction with human erythrocytes in Entamoeba histolytica.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Special Issue “Virulence and Parasitism of Parasitic Protozoa”, Microorganisms	6．最初と最後の頁 1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms8071050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Nakada-Tsukui, K. and Nozaki, T.	4．巻 4
2．論文標題 The emerging role of trogocytosis in the evasion of cancers and parasitic protists from immune cells.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Editorial Commentary, Biotarget.	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/biotarget.2020.03.02	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T.	4．巻 22(3)
2．論文標題 Two isotypes of phosphatidylinositol 3-phosphate binding sorting nexins play distinct roles in trogocytosis in Entamoeba histolytica.	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Cell Microbiol	6．最初と最後の頁 e13144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.13144.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Tomii, K., Santos, H. J., and Nozaki, T.	４．巻 10(11)
２．論文標題 Genome-wide analysis of known and potential tetraspanins in Entamoeba histolytica.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Genes (Basel), Microbial Genetics and Genomics	６．最初と最後の頁 E885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes10110885.2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Santos, H. J., Hanadate, Y., Imai, K., Nozaki, T.	４．巻 10(5)
２．論文標題 An Entamoeba-specific mitosomal membrane protein with potential association to the Golgi apparatus.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Genes (Basel)	６．最初と最後の頁 E367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes10050367.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Nakada-Tsukui, K., Watanabe, N, Maehama, T., Nozaki, T.	４．巻 9
２．論文標題 Phosphatidylinositol kinases and phosphatases in Entamoeba histolytica.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Front. Cell. Inf. Microbiol.	６．最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2019.00150.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Santos, H. J., Imai, K., Makiuchi, T., Tomii, K., Horton, P., Nozawa, A., Okada, K., Tozawa, Y., Nozaki, T.	４．巻 286
２．論文標題 Lineage-specific transmembrane β-barrel proteins in the endoplasmic reticulum of Entamoeba histolytica.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 FEBS J.	６．最初と最後の頁 3416-3432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.14870.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計18件（うち招待講演　2件／うち国際学会　14件）

１．発表者名
Nozaki, T.

２．発表標題
Host modulation by excreted proteins from the extracellular intestinal parasite. Plenary lecture in Bridging Session.

３．学会等名
The 16th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology and 16th Internationa Congress of Mycology and Eukaryotic Microbiology and 18th International Congress of Virology, IUMS2020（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2020年

１．発表者名
Nozaki, T.

２．発表標題
Drug discovery against malaria and amebiasis using natural bioresources and chemical libraries. United States-Japan Cooperative Medical Science Program.

３．学会等名
The 50th Joint Conference on Parasitic Diseases（国際学会）

４．発表年
2020年

１．発表者名
Kumiko Nakada-Tsukui, Natsuki Watanabe, Tomoo Maehama, Tomoyoshi Nozaki.

２．発表標題
Phosphatidylinositol kinases and phosphatases in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica.

３．学会等名
ASCB|EMBO 2019 meeting（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Nozaki, T.

２．発表標題
Drug development against tropical infectious diseases using natural bioresources.

３．学会等名
ICMR-DST-AMED Workshop for India-Japan Collaboration（国際学会）

４．発表年
2019年

1．発表者名 Kumiko Nakada-Tsukui, Kumiko Shibata, Tomoyoshi Nozaki.
2．発表標題 Atg8 is differentially recruited to two types of phagosomes in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica.
3．学会等名 the 9th international symposium on autophagy（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Watanabe, N., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T.
2．発表標題 Two isotypes of phosphatidylinositol 3-phosphate-binding sorting nexins play distinct roles in trogocytosis in Entamoeba histolytica. Eukaryome impact on Intestine homeostasis and mucosal immunology.
3．学会等名 Institut Pasteur（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Nakada-Tsukui, K., Suzuki, M., and Nozaki, T.
2．発表標題 What determines trogocytosis and phagocytosis? Eukaryome impact on Intestine homeostasis and mucosal immunology.
3．学会等名 Institut Pasteur（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Nozaki, T and Jeelani G.
2．発表標題 Biochemical, structural and functional characterization of glycerol kinase from human enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica.
3．学会等名 第92回日本生化学会大会 シンポジウム 構造生物学から見た寄生適応の分子戦略
4．発表年 2019年

１．発表者名
Tomoyoshi Nozaki, Koushik Das.

２．発表標題
A novel parasite-secreted lysine and glutamic acid rich protein 2 from Entamoeba histolytica infiltrates the host nucleus and regulates the host-parasite interaction.

３．学会等名
VIII European Congress of Protistology (ECOP)（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Herbert J. Santos, Yuki Hanadate, Kenichiro Imai, and Tomoyoshi Nozaki.

２．発表標題
A lineage-specific mitosomal membrane protein possibly involved in mitosome-endosome membrane contact site in Entamoeba histolytica.

３．学会等名
VIII European Congress of Protistology (ECOP)（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
津久井久美子，渡辺菜月，前濱朝雄，野崎智義

２．発表標題
赤痢アメーバ原虫のホスファチジルイノシトール代謝酵素のゲノム解析

３．学会等名
第19回日本蛋白質科学会年会／第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会

４．発表年
2019年

１．発表者名
Nozaki, T.

２．発表標題
Metabolomic analysis uncovers unexpected metabolic pathways in the enteric parasite Entamoeba histolytica

３．学会等名
GlycoNov9: 9th Meeting ACETOTRYP/GLYCONOV（国際学会）

４．発表年
2019年

1．発表者名 Nozaki, T. and Das, K.
2．発表標題 Host modulation by Entamoeba histolytica via secreted lysine and glutamic acid rich protein 2. Eukaryome impact on Intestine homeostasis and mucosal immunology.
3．学会等名 Institut Pasteur（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Nozaki, T.
2．発表標題 Pathogenesis of amebiasis and drug development against parasitic diseases using microbial megabiodiversity. Departmento of Microbiology & Immunology Programme Seminar Series.
3．学会等名 National University of Singapore（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2020年

1．発表者名 Natsuki Watanabe, Tomoyoshi Nozaki, Kumiko Nakada-Tsukui
2．発表標題 Functional analysis of PI3P effecto candidate SNX in Entamoeba histolytica
3．学会等名 XIXth International Seminar on Amebiasis（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 Somlata, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki
2．発表標題 Discovery of AGC kinase that differentiates trogocytosis from phagocytosis
3．学会等名 XIXth International Seminar on Amebiasis（国際学会）
4．発表年 2018年

１．発表者名 津久井久美子、渡辺菜月、前濱朝彦、野崎智義
２．発表標題 赤痢アメーバ原虫のホスファチジルイノシトールシグナルと貪食の分子機構
３．学会等名 26回分子寄生虫学ワークショップ／第16回分子寄生虫学・マラリア研究フォーラム合同大会
４．発表年 2018年

１．発表者名 津久井久美子、渡辺菜月、前濱朝彦、野崎智義
２．発表標題 赤痢アメーバ原虫のホスファチジルイノシトールシグナルと貪食胞成熟の分子機構
３．学会等名 第91回日本生化学会大会
４．発表年 2018年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	Ｊｅｅｌａｎｉ　Ｇｈｕｌａｍ (Jeelani Ghulam) (60468519)	東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教 (12601)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
インド	Jamia Islamia大学			