

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07087

研究課題名(和文) 赤痢アメーバ含硫脂質代謝に不可欠な輸送体群の同定と機能解析

研究課題名(英文) Intracellular localization of sulfolipids in Entamoeba

研究代表者

見市 文香(三田村文香)(Mi-ichi, Fumika)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：70576818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では赤痢アメーバが合成する含硫脂質の1つであるコレステロール硫酸(CS)の輸送に着目、細胞外に添加したCSの動態および細胞に与える影響を解析した。その結果、CSがシスト形成において、細胞膜に直接作用して細胞の球形化を誘導し、シスト壁形成の完了に繋がること、細胞膜の透過性を低下させ、成熟シストが乾燥耐性を獲得することを見出した。さらに、CSによる細胞膜透過性の低下には、超長鎖セラミド合成の誘導が重要であることも見出した(Mi-ichi et al, mSphere, 2021; Mi-ichi et al, mSphere, 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではコレステロール硫酸が赤痢アメーバのシスト形成において、細胞膜に直接作用して細胞の球形化を誘導し、シスト壁形成の完了に繋がること、細胞膜の透過性を低下させ、成熟シストが乾燥耐性を獲得することを見出した。シストは寄生原虫が次の宿主へと到達するための必須形態であり、その形成過程の分子機構の解明は「寄生適応」という観点から寄生虫学の中心命題の1つである。一方で、休眠化は宿主への感染メカニズムを解き明かすことに繋がる。以上のことから、本研究によって得られた成果は赤痢アメーバの寄生適応戦略を解明する基礎研究としての意義と社会的意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Entamoeba histolytica, a protozoan parasite, causes amoebiasis, which is a global public health problem. We previously showed that cholesteryl sulfate (CS) plays an important role in Entamoeba encystation, a cell differentiation process from proliferative trophozoite into dormant cyst (Mi-ichi et al, PNAS 2015).

In this project, we analyzed the cellular localization of CS and its precious role during Entamoeba encystation using in vitro cultures of Entamoeba invadens as a E. histolytica model. Results showed that CS induced and maintained encysting cells as spherical maturing cysts in a dose-dependent manner. CS-treatment also caused time- and dose-dependent development of membrane impermeability in encysting cells via induction of de novo synthesis of dihydroceramides containing very long N-acyl chains(Mi-ichi et al, mSphere 2021; Mi-ichi et al, mSphere, 2022). Hence, these results indicate that CS-mediated morphological and physiological changes is necessary to form mature cysts.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：赤痢アメーバ シスト形成 含硫脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバは、ヒトの大腸に感染しアメーバ赤痢症を引き起こす原虫である。臨床薬が少なく、病原性の解明、新規薬剤開発が危急の課題である。これまで申請者は、赤痢アメーバの含硫脂質代謝に着目し研究を進めている。

硫酸代謝は、生物界に普遍的に存在する重要な代謝経路である。しかし、赤痢アメーバの硫酸代謝は、ヒトを含む多くの生物とは大きく異なり、含硫脂質代謝に特化している。申請者らは、最終代謝産物の1つコレステロール硫酸がシスト形成に必須な分子であることを見出した (Mi-ichi *et al*, *PNAS* 2015)。さらに近年、他の最終代謝産物として、新規含硫脂質 fatty alcohol disulfates を同定し、この分子が栄養体期の原虫生存に必須であることも見出した (Mi-ichi *et al*, *Mol Microbiol* 2017)。つまり赤痢アメーバの含硫脂質代謝は、生活環を通じて重要な代謝経路である。しかし、基質ならびに中間体の輸送については、未解明な点が多い (下図参照)。赤痢アメーバの含硫脂質代謝の全容を理解し、新規抗アメーバ薬創生に資する基盤的知見を提供するには、これらの輸送系の分子機構の解明は必須である。

本申請研究では含硫脂質代謝に必須な輸送体群の同定および特徴を明確化することを目的とする。含硫脂質の合成に必要な基質である無機硫酸および脂質は細胞外から供給される。細胞外から取り込まれた硫酸は、ミトソーム内へと輸送され活性化を受ける (含硫脂質代謝の最初のステップである硫酸活性化がミトソーム内に局在するため)。活性化された硫酸 (PAPS) は再び細胞質へと輸送され、硫酸基転移酵素 (SULTs) の基質となり、7種類の含硫脂質の合成に使用される。そのうちコレステロール硫酸と fatty alcohol disulfates は細胞内に蓄積、一方、構造が未同定の3種類 (SL-II-IV) については、細胞外へと放出されることを見出している (Mi-ichi *et al*, *Mol Microbiol* 2017)。近年申請者らは、PAPS をミトソームから細胞質へと輸送する輸送体が mitochondrial carrier family (MCF) であること、そしてこの MCF が対向輸送体として ATP (硫酸活性化に必須分子) を細胞質からミトソームに取り込む機能を持つことを報告した (Mi-ichi *et al*, *Eukaryotic Cell* 2015)。しかしながら、輸送体の存在が示唆される多くのステップについては未だ解明されていない。

本申請研究では未同定のステップに関わる輸送体群の同定および機能解析、さらに、その特性の明確化を試みる。

2. 研究の目的

本申請研究では、具体的に、その存在が赤痢アメーバの含硫脂質代謝において不可欠と推定される以下の3種類の輸送体について、

- 1) 硫酸の輸送を担うもの (細胞外 細胞質、細胞質 ミトソーム)
- 2) 脂質の輸送を担うもの (細胞外 細胞質)
- 3) 含硫脂質代謝産物3種類 (SL-II-IV) の輸送を担うもの (細胞質 細胞外)

それぞれの同定および機能解析、さらには、その特性の明確化を試みる。

3. 研究の方法

1) 赤痢アメーバのゲノム情報から輸送を担うと考えられる輸送体の遺伝子の探索を行った。結果、硫酸ナトリウム共輸送体5種類、ABC輸送体23種類を輸送体候補として得た。これらの遺伝子発現抑制株を作製した。

2) 1) で得られた遺伝子発現抑制株28種類を用いて、放射ラベルされた硫酸を用いて代謝ラベル実験を行い、含硫脂質の蓄積や、細胞外への輸送に変化がある株のスクリーニングを行った。

3) 輸送体を介さない輸送 (膜への直接導入) の可能性を検討した。シスト形成に重要な役割を持つコレステロール硫酸について解析を行った。最初に栄養体、シスト期の細胞内のコレステロール硫酸の濃度を測定した。細胞内の濃度と同じ濃度のコレステロール硫酸を細胞外から単独で加えた時の細胞に与える影響を解析した。

4. 研究成果

赤痢アメーバのゲノム情報から輸送を担うと考えられる輸送体の遺伝子の探索を行った結果硫酸ナトリウム共輸送体5種類、ABC輸送体23種類を輸送体候補として得た。これらの遺伝子発現抑制株を作製、放射ラベルされた硫酸を用いて代謝ラベル実験を行ったが、含硫脂質の蓄積や、細胞外への輸送に変化がある株を得る事は出来なかった。

そこで、輸送体を介さない輸送 (膜への直接導入) の可能性を検討した。シスト形成に重要な役割を持つコレステロール硫酸について解析を行った。最初に栄養体、シスト期の細胞内のコレ

ステロール硫酸の濃度を測定したところ、栄養体期は $243 \pm 37 \mu\text{M}$ 、コレステロール硫酸は $539 \pm 37 \mu\text{M}$ であった。ヒトの血清中のコレステロール硫酸の濃度が $3.7\text{--}6.9 \mu\text{M}$ であることと比較すると非常に高濃度であることが分かる。

そこで、細胞外に細胞内の濃度と同じ濃度のコレステロール硫酸 ($0, 100, 300, 500 \mu\text{M}$) を細胞外から単独で加えた時の細胞に与える影響を解析した。その結果、CS がシスト形成において、細胞膜に直接作用して細胞の球形化を誘導し、シスト壁形成の完了に繋がること、細胞膜の透過性を低下させ、成熟シストが乾燥耐性を獲得することを見出した。さらに、CS による細胞膜透過性の低下には、超長鎖 (炭素数 26-30) のジヒドロセラミド合成の誘導が重要であることも見出した (Mi-ichi *et al*, *mSphere*, 2021; 論文投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mousa Eman Abdelazeem Abuelwafa, Sakaguchi Miako, Nakamura Risa, Abdella Osama Hussein, Yoshida Hiroki, Hamano Shinjiro, Mi-ichi Fumika	4. 巻 147
2. 論文標題 The dynamics of ultrastructural changes during Entamoeba invadens encystation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 1305 ~ 1312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S0031182020001079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mi-ichi Fumika, Ikeda Kazutaka, Tsugawa Hiroshi, Deloer Sharmina, Yoshida Hiroki, Arita Makoto	4. 巻 6
2. 論文標題 Stage-Specific De Novo Synthesis of Very-Long-Chain Dihydroceramides Confers Dormancy to Entamoeba Parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 00174-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSphere.00174-21	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 Shinjo N, Nakayama H, Ishimaru K, Hikosaka K, Mi-ichi F, Norose K, Yoshida H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Hypericum erectum alcoholic extract inhibits Toxoplasma growth and Entamoeba encystation: an exploratory study on the anti-protozoan potential.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nat Med.	6. 最初と最後の頁 294-305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01369-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mi-ichi F, Ishikawa T, Tam VK, Deloer S, Hamano S, Hamada T, and Yoshida H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of Entamoeba histolytica adenosine 5'-phosphosulfate (APS) kinase; validation as a target and provision of leads for the development of new drugs against amoebiasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Negl Trop Dis.	6. 最初と最後の頁 e0007633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pntd.0007633	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 Mi-ichi F, Yoshida H	4. 巻 20
2. 論文標題 Unique Features of Entamoeba Sulfur Metabolism; Compartmentalization, Physiological Roles of Terminal Products, Evolution and Pharmaceutical Exploitation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 pii: E4679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194679	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 見市文香	4. 巻 269 No.13.
2. 論文標題 脂質代謝と寄生適応戦略 - 赤痢アメーバの硫酸代謝の特殊性.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1229-1236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mi-ichi Fumika, Miyake Yasunobu, Tam Vo Kha, Yoshida Hiroki	4. 巻 8
2. 論文標題 A Flow Cytometry Method for Dissecting the Cell Differentiation Process of Entamoeba Encystation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2018.00250	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 Tong Honglian, Miyake Yasunobu, Mi-ichi Fumika, Iwakura Yoichiro, Hara Hiromitsu, Yoshida Hiroki	4. 巻 13
2. 論文標題 Apaf1 plays a negative regulatory role in T cell responses by suppressing activation of antigen-stimulated T cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0195119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0195119	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 Mi-ichi Fumika, Sakaguchi Miako, Hamano Shinjiro, Yoshida Hiroki	4. 巻 9
2. 論文標題 <i>Entamoeba</i> Chitinase is Required for Mature Round Cyst Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0051121.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/Spectrum.00511-21	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 Mi-ichi Fumika, Tsugawa Hiroshi, Arita Makoto, Yoshida Hiroki	4. 巻 7
2. 論文標題 Pleiotropic Roles of Cholesteryl Sulfate during <i>Entamoeba</i> Encystation: Involvement in Cell Rounding and Development of Membrane Impermeability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e0029922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/msphere.00299-22	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 見市文香、石川岳志、Vo kha Tam, Sharmina Deloer、濱野真二郎、吉田裕樹.
2. 発表標題 赤痢アメーバ “ 硫酸活性化 ” 第2酵素を標的とする阻害剤の探索
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 見市文香
2. 発表標題 赤痢アメーバの脂質代謝の特殊性
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumika Mi-ichi, Tomofumi Miamoto, Hiroki Yoshida.
2. 発表標題 Uniqueness of Entamoeba sulfur metabolism; fatty alcohol disulfates, novel sulfur metabolites, play an important role in trophozoite proliferation.
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 見市文香、Vo Kha TAM, Sharmina Deloer, 吉田裕樹
2. 発表標題 赤痢アメーバ含硫脂質代謝を標的とする阻害剤の探索
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 見市文香
2. 発表標題 赤痢アメーバの生化学含硫脂質代謝の全容解明をめざして.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 見市文香、Vo Kha Tam, Sharmina Deloer, 吉田裕樹
2. 発表標題 赤痢アメーバ硫酸活性化第二酵素を標的とする阻害剤の探索
3. 学会等名 第72回日本寄生虫学会南日本支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumika M
2. 発表標題 “Entamoeba encystation has a causal link to the unique sulfur metabolism.”
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumika Mi-ichi, Yasunobu Miyake, Vo Kha Tam, and Hiroki Yoshida
2. 発表標題 A new method for dissecting the cell differentiation process of Entamoeba encystation
3. 学会等名 The 49th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 見市文香、三宅靖延、Vo Kha Tam、吉田裕樹
2. 発表標題 Entamoebaシスト形成に伴う細胞分化のフローサイトメトリー法を用いた新規解析法の導入
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 見市文香、三宅靖延、山口タム、吉田裕樹
2. 発表標題 Entamoebaシスト形成に伴う細胞分化の新規解析法の導入
3. 学会等名 第71回日本寄生虫学会南日本支部大会 / 第68回日本衛生動物学会南日本支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 見市文香
2. 発表標題 腸管寄生原虫“赤痢アメーバ”生体膜脂質の網羅解析と特徴的に検出された超長鎖セラミドの機能解明
3. 学会等名 第15回メタボロームシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見市文香、坂口美亜子、濱野真二郎、吉田裕樹
2. 発表標題 腸管寄生原虫“赤痢アメーバ”の休眠化機構“シスト形成”におけるキチナーゼの機能解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見市文香、坂口美亜子、濱野真二郎、吉田裕樹
2. 発表標題 Entamoebaシスト形成におけるキチナーゼの機能解析
3. 学会等名 第73回日本寄生虫学会南日本支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見市文香、池田和貴、津川裕司、Sharmina Deloer、吉田裕樹、有田誠
2. 発表標題 Entamoebaシスト形成に伴う膜の透過性の低下に関する超長鎖ジヒドロセラミドの解析
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eman Abdelazeem Abuelwafa Mousa、坂口美亜子、中村梨沙、吉田裕樹、濱野真二郎、見市文香。
2. 発表標題 Entamoeba シスト形成に伴う形態変化の経時的解析
3. 学会等名 90回日本寄生虫学会 第32回日本臨床寄生虫学会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://mcis-sagamed.info/whatsnew/873/ http://mcis-sagamed.info/whatsnew/777/ http://mcis-sagamed.info/whatsnew/907/ http://mcis-sagamed.info/whatsnew/901/
--

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

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
---------	---------