

平成21年 3月30日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790311
 研究課題名 (和文) 寄生性原虫のリソソーム輸送における特殊性と多様性に関する解析
 研究課題名 (英文) Specificity and diversity of lysosomal traffic in protozoan parasite

研究代表者
 中野 (齊藤) 由美子 (NAKANO (SAITO) YUMIKO)
 国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官
 研究者番号：30321764

研究成果の概要：リソソームへの膜融合は Rab7 という GTPase によって担われる。多くのモデル生物や寄生性原虫では Rab7 はゲノムに1種しかコードされないが、赤痢アメーバには9種のアイソタイプが存在し、リソソーム周辺で異なる機能を担っていることを明らかにした。赤痢アメーバがリソソームに病原因子を蓄積し病原性を発揮するには、複雑なリソソーム輸送と多様な機能を担う Rab7 が必要なのではないかと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：分子・原虫・オルガネラ・細胞内トラフィック・多様性

1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバ症は赤痢アメーバによって引き起こされる、下痢、大腸炎、肝膿瘍を主症状とする感染症であり、国内では年間700例の感染と、数例の死亡が報告される感染症法5類の感染症である。

申請者のこれまでの解析により、赤痢アメーバの主要な病原因子であるシステインプロテアーゼはリソソームに蓄積されており、リソソーム周辺の細胞内輸送機構がアメーバの病原性の理解に重要であることが解明されてきた。さらに近年の赤痢アメーバのゲノムプロジェクトの終了に伴い、申請者は赤痢アメーバの細胞内輸送に関与す

る Rab GTPase はヒトや高等植物よりも多様化しており、リソソーム輸送に関与すると予想される Rab7 が9種と最も大きなサブファミリーを形成していることが明らかにされてきた。

2. 研究の目的

本研究では、寄生性原虫赤痢アメーバにおけるリソソーム輸送の複雑さの意義を明らかにする目的で、それぞれの Rab7 アイソタイプの特殊な機能を明確にする。また、なぜ赤痢アメーバに Rab が多様化する必要があるのかを Rab7 アイソタイプの機能特異性を明らかにすることで解明する。

3. 研究の方法

(1) Rab7 アイソタイプの定量 PCR

定常状態の赤痢アメーバ HM1:IMSS cl6 細胞から mRNA を抽出し、polyA-RNA を合成した。定量 PCR は各アイソタイプ間に特異的な C 末端 200bp を増幅させ、ABI PRISM 7700 を用いて解析した。種内コントロールには RNA polymerase II 15kDa サブユニットを用いた。

(2) 定常状態における細胞内局在

発現量の高い Rab7B, 7D, 7E, 7G, 7H について、全長を大腸菌内で発現させた。それぞれの組換え蛋白質を精製し、ウサギに免疫を行った。得られた抗血清を用いて、赤痢アメーバでの細胞内局在を観察するために間接蛍光観察を行った。リソソームは LysoTracker Red を用いて染色した。

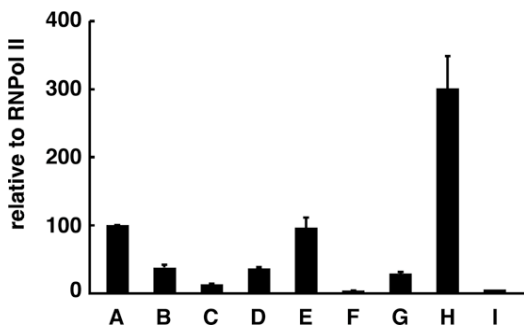
(3) 大量発現株を用いた解析

複数の Rab7 アイソタイプの細胞内共局在を観察するために、Rab7B に 3HA のタグを N 末端に付加させ、赤痢アメーバ内で大量発現する形質転換株を作製した。Rab7B についてはその機能をさらに詳細に解析する目的で、ドミナントネガティブ変異 H69L も発現させた。ファゴソームの pH は FITC でラベルした酵母を食させ、495nm と 440nm で励起したときの発光の比を計測することで求めた。

4. 研究成果

(1) 定常状態における Rab7 の発現

9 種の Rab7 アイソタイプのうち、定常状態での発現が高いものは 7A, 7B, 7D, 7G, 7H であった。発現量が少ない 7C, 7E, 7I も僅かながら定常状態での発現が認められ、偽遺伝子でないことが示された。ハムスターを用いた動物モデルの肝膿瘍から得られた病原株を用いて、病原株に於ける Rab7 の発現変化を検討したが、アイソタイプの発現に変化は見られなかった。



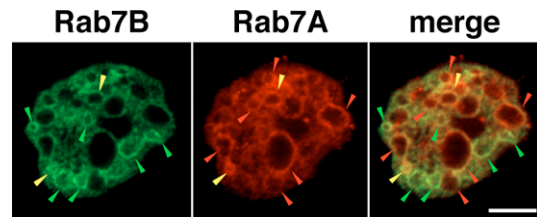
(2) 定常状態における局在

Rab7B, 7D, 7E, 7G に特異的に反応するウサギ抗血清を用いて細胞内局在を間接蛍光抗体法により観察したところ、7B, 7E, 7G は

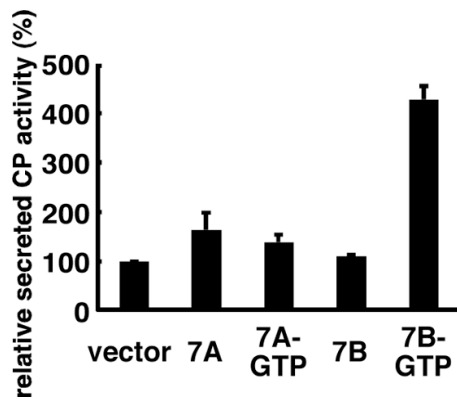
リソソームに局在することが分かった。さらに、7E と 7G はリソソーム以外にも細胞内の小胞上に局在した。7D は定常状態ではリソソーム上に局在しなかったが、赤血球の食食刺激によって形成される前食食胞上に局在し、食食開始 30 分後に 7D が局在する前食食胞が酸性化した。よって、各々の Rab7 アイソタイプは細胞内局在が異なるが、リソソーム周辺で機能していることが明らかになった。

(3) Rab7B と Rab7A の機能分け

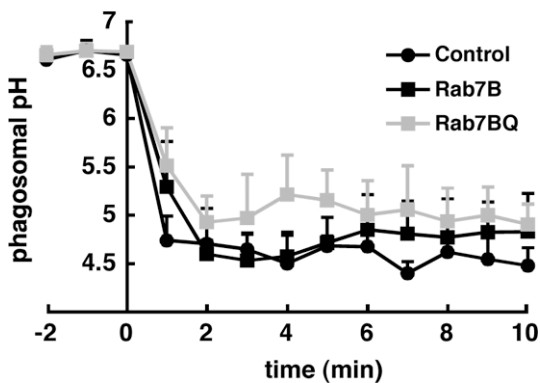
Rab7B と Rab7A の共局在を観察する為に、3HA-Rab7B 大量発現株を用いて、Rab7B の局在は抗 HA 抗体、Rab7A の局在を抗 Rab7A ウサギ抗体で染色した。その結果、定常状態では多くの Rab7B と Rab7A は共局在しないことが分かった (下図)。つまり、28% の Rab7B 陽性空胞は Rab7A と共局在し、60% の Rab7A 陽性空胞が Rab7B と共局在した。このことは、Rab7B と Rab7A が部分的に異なる空胞に局在していることを示している。



3HA-Rab7B 発現株を用いてリソソーム酵素であるシステインプロテアーゼ (CP) とアメーバポア (AP) の局在を観察したところ、3HA-Rab7B 空胞には CP, AP ならびに LysoTracker Red が含まれていることを示した。そこで、リソソーム酵素の輸送を阻害する目的で 3HA-Rab7B H69L 変異を発現させた。その結果、野生型 3HA-Rab7B 発現で観察された空胞が形成されなかった。細胞分画を行ったところ、3HA-Rab7B H69L 蛋白質は半分以上が可溶画分に回収された。さらに、3HA-Rab7B H69L 発現株は CP の細胞外への分泌が上昇していることが明らかとなった (下図)。この現象は Rab7B に特異的であり、Rab7A のドミナントネガティブ変異を発現させた株では観察されなかった。よって、Rab7A と Rab7B は一部の局在を共有しつつも機能は異なり、Rab7B は Rab7A よりもリソソームに近い経路で機能していることが分かった。



Rab7B がリソソームへの融合に関与しているならば、リソソームの酸性度にも影響を与える可能性がある。そこで FITC ラベルした酵母を食食させることによりリソソームの pH を計測した。その結果、食食開始 2-10 分間の pH の平均はコントロールの株では 4.58 ± 0.11 であったのに対し、3HA-Rab7B H69L 発現株では 5.01 ± 0.1 と上昇していた。よって、3HA-Rab7B H69L の発現はリソソーム酵素の輸送に障害を与えるだけでなく、リソソームの酸性化にも影響を与えることが分かった。



(4) まとめ

本研究結果は、赤痢アメーバの Rab7 アイソタイプには機能分けがあることを明らかにした。モデル生物や多くの原虫では Rab7 が 1 種しかゲノムにコードされていないのに対し、赤痢アメーバは 9 種の Rab7 アイソタイプをコードする。そして、そのアイソタイプ間の機能と局在は同一でなく、1 種ごとの Rab7 アイソタイプが異なる機能を担うことが分かった。赤痢アメーバの病原性を理解する上で、リソソーム酵素の輸送は非常に重要である。よって、赤痢アメーバは宿主に寄生するにあたって、リソソームへの輸送系を多様化する必要があったのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Saito-Nakano, Y., Mitra, B.N., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., Nozaki, T. (2007) Two Rab7 isotypes, *EhRab7A* and *EhRab7B*, play distinct roles in biogenesis of lysosomes and phagosomes in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 9:1796-1808. 査読有
- ② Mitra, B.N., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., Sato, D., Nozaki, T. (2007) Rab11B small GTPase regulates secretion of cysteine proteases in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 9:2112-2125. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① Saito-Nakano, Y., Okada, M., Gilchrist, CA., Crasta, O., Petri, WA., Fei, Z., Trapaidze, N., Nozaki, T. (2009) Role of Arf GTPase for pathogenesis and lysosomal formation in *Entamoeba histolytica*. 43rd Annual U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases, Tokyo, Jan 7-8, 2009
- ② 中野由美子、中野賢太郎、野崎智義 (2008) 原虫におけるメンブレントラフィックの多様性. 第 10 回日本進化学会 ワークショップ 2008 年 8 月 22-24 日, 東京
- ③ Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nozaki, T. (2007) Role of Arf GTPase for pathogenesis in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 科学研究費補助金特定領域研究「メンブレントラフィック」国際シンポジウム「メンブレントラフィック」兼平成 19 年度全体班会議. 平成 19 年 11 月 27-29 日. 淡路夢舞台国際会議場
- ④ 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2007) 赤痢アメーバの病原機構におけるリソソーム形成とメンブレントラフィック 第 6 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2007 年 10 月 27-28 日, 松山
- ⑤ Saito-Nakano, Y. and Nozaki, T. (2007) Role of cholesterol for pathogenesis in

protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 2007年5月28-30日, 福岡

- ⑥ 中野由美子 (2008) ファゴサイトーシスを有する原虫はメンブレントラフィックが多様であるか? (Does protozoa possessing phagocytic capacity have a variety of membrane traffic pathways?) 第77回日本寄生虫学会大会 2008年4月2-4日, 長崎.

[図書] (計1件)

- ① Clark, C.G., Hofer, M., Alsmark, U.C.M., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Marion, S., Weber, C., Mukherjee, C., Bruchhaus, I., Tannich, E., Leippe, M., Sicheritz-Ponten, T., Foster, P.G., Noel, C.J., Hirt, R.P., Embley, T.M., Samuelson, J., Gilchrist, C.A., Mann, B.J., Singh, U., Ackers, J.P.,

Bhattacharya, S., Bhattacharya, A., Lohia, A., Guillen, N., Duchene, M., Nozaki, T., Hall, N. (2007) Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. *Advances in Parasitology* 65:51-190. 査読有

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 (齊藤) 由美子
(NAKANO (SAITO) YUMIKO)

研究者番号 : 30321764