

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02723

研究課題名（和文）赤痢アメーバの病原機構における脂質輸送タンパク質の機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis of lipid transfer proteins from *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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：LTP15は赤痢アメーバのSTARTドメイン含有タンパク質で核移行ドメインをもち、転写・クロマチン制御、核-細胞質輸送を担うと予想された。LTP4のタグ融合タンパク質を用いてLTP15が通常核に存在し、栄養飢餓条件下で細胞質へと移行することを示した。LTP15は液性因子の取り込み後の放出、システインプロテアーゼの分泌、病原機構へ関与した。LTP15は酸化ストレスへの応答に関与し、核内でのPIPsの維持に重要であった。本研究成果はLTPsの核内のリン脂質の代謝と病原性への関与を原虫で初めて示し、LTPsの機能・進化の普遍性の理解と赤痢アメーバの治療・予防への応用を可能とする基盤的な成果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はLTPsの核内のリン脂質の代謝と病原性への関与を原虫で初めて示した点で極めて新規性が高く、更に、真核生物におけるLTPsの多様性と機能の進化と普遍性の理解の助けとなった。同時に、本研究成果は赤痢アメーバの治療・予防への応用を可能とする基盤的な成果となった。本研究成果は他の寄生虫症やヒトの疾患の病態や治療法の理解に役立つ情報を提供したといえる。

研究成果の概要（英文）：Phospholipids, their biosynthesis, and functional implications in the nucleus have been recently unraveled from eukaryotes. In the present study, we have identified for the first time a lipid transfer protein (LTP) from a protozoan parasite *E. histolytica* (EhLTP15) that is involved in nuclear-cytoplasmic lipid transport and regulation of nuclear lipid metabolism and homeostasis. EhLTP15 translocated from the nucleus to the cytoplasm under nutrient deprived conditions. EhLTP15 was also involved in exocytosis of pinocytosed fluid phase marker and secretion of lysosomal enzymes, cysteine proteases, which are implicated for virulence and tissue invasion of this enteric pathogen. EhLTP15 was also involved in the defense against oxidative stress. Furthermore, EhLTP15 was necessary to maintain the levels of nuclear phosphoinositides. This study has provided a link between non-vesicular lipid transport and nuclear lipid metabolism for the first time in any unicellular eukaryotes.

研究分野：寄生虫学、感染症学、病原学

キーワード：脂質 輸送 感染症 寄生虫 病原機構

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リン脂質は生体膜を構成する重要な脂質である。高度に細分化された細胞内区画をもつ真核細胞は、複数のオルガネラの特定のドメインに多様なリン脂質、特にフォスファチジルイノシトールリン酸(phosphatidylinositol phosphates, PIPs)を分布させ、その種・量を時空間的に制御している。PIPは細胞シグナル伝達、細胞骨格、小胞輸送、遺伝子発現、ストレス応答など細胞機能制御に不可欠な役割を果たす。細胞内のリン脂質や PIPs の種・量・分布は代謝と輸送により制御される。リン脂質結合タンパク質は様々な細胞内経路に重要な機能を果たすことがモデル生物及びヒトにおいて知られている。例えばオルガネラ間の脂質輸送(e.g., PtdIns を ER から Golgi/形質膜に、phosphatidic acid を逆方向に)、PIP 代謝酵素との相互作用(e.g., kinase, phosphatase への基質の提示 or 隔離)、PIP を介したシグナル伝達、脂質センシング(SEC14 は phosphatidylcholine (PC) センサーとして Golgi の PC と diacylglycerol 量を調節)、小胞輸送(ORP は Rab と結合し PI(4,5)P₂ 濃度・局在を介して exocytosis を制御)、核機能(転写, クロマチンリモデリング, mRNA 成熟, stress 応答)、細胞運動(Ras, Rho-GAP に結合し細胞骨格を制御)などがモデル生物やヒトで示されている。PIP の合成・分解を担う酵素(kinases と phosphatases)は我々のインシリコ解析により、その全容が把握され、他種生物とのアナロジーによって、個別の酵素の機能は理解されつつある。一方近年のモデル生物での研究により、PIP の輸送は脂質輸送タンパク質(lipid transfer protein, LTP)と呼ばれる 4 種類のタンパク質ファミリーによって制御されることが示されつつある。しかしながら、LTP による PIPs 輸送が原虫・寄生虫に存在するのか、寄生・病原機構における LTP と PIPs 輸送の具体的な役割とその分子機構に関する理解は極めて希薄である

2. 研究の目的

本研究は「脂質輸送タンパク質 LTPs と、LTP による PIPs 輸送制御が原虫・寄生虫の病原性発現(哺乳動物の貪食・破壊や病原性因子(protease など)の細胞外への分泌)にどのように関与しているのか?」を明らかにすることを目的とする。上記の問いを踏まえ、以下の具体的な研究方法により目的を達成する。最終的なゴールは LTP による細胞機能(運動・エンドサイトーシス・貪食・咀嚼食・分泌・細胞破壊・増殖)制御の詳細な分子メカニズムを解明し、寄生原虫の病原機構における LTP の生理学的・進化的意義を解明することである。更に、START ドメインタンパク質ファミリーが、赤痢アメーバでどのように特異的に多様化したのかという進化的な命題を理解することに繋がると期待される。START ドメインを含むタンパク質はゲノム中で最も多様な(15 種類)アイソタイプとして存在するが、我々の先行研究により重要性の示された 3 種類の脂質輸送タンパク質 (LTP1, 3, 4)を中心として研究を展開し、赤痢アメーバの病原機構における脂質輸送分子基盤を確立することを目的とした。LTP1 と LTP3 はいずれも貪食・咀嚼食やヒト細胞破壊に協調して関与する。また、LTP1 は運動・プロテアーゼ分泌にも、LTP3 はピノサイトーシスにも選択的に関与する。一方 LTP4 は核移行すると予想される唯一の START ドメインタンパク質であった。

3. 研究の方法

LTP1 は運動に選択的に、LTP3 はエンド(ピノ)サイトーシス、分泌に選択的に関与するが、その関与する経路を限定する分子機構を分子生物学、細胞生物学、生化学的手法を用いて解析する。具体的には、LTP1/3 が実行する経路(運動・分泌 vs エンドサイトーシス)における下流の特異的実行分子を生化学的に特定し、その機能を個別に詳細に明らかにする。更に、LTP1/3 はいずれも貪食・咀嚼食、細胞破壊、細胞増殖に関与するが、LTP1/3 が選択的に調節する特異経路を規定する鍵タンパク質が、貪食・咀嚼食、細胞破壊、細胞増殖を、どのように協調的に調節しているかをライブイメージングにより時空間的分解的に理解することを試みる。更に(以下が主要な成果となるが) START ドメイン含有タンパク質の中に核移行シグナル(NTS, BUD13 ドメイン)を有するタンパク質(LTP15, EHI_155260)があり、核内での機能が演繹される。この核内 LTP の機能を病原機構の点に特に注目して理解する。

4. 研究成果

主要な成果である LTP4 に関する成果に関して記述する。LTP15(EHI_155260)は赤痢アメーバの START ドメイン含有タンパク質の中にあって唯一核移行シグナル(NTS, BUD13 ドメイン)をもち、転写・クロマチン再構成など核機能制御、核-細胞質輸送などの機能を担うことが予想された。LTP4 の GFP, HA タグ融合タンパク質を発現する赤痢アメーバ株を作成し、LTP15 の細胞内挙動を確認した。LTP15 は通常確認存在するが、栄養飢餓条件下で細胞質へと移行することが確認された。更に、LTP15 は液性因子のエンドサイトーシス後のエクソサイトーシス、システインプロテアーゼの分泌に関与していることが示され、病原機構への関与が示された。また、LTP15 は酸化ストレスへの応答に関与していること、核内での phosphatidylinositol phosphates レベルの維持に重要であることが確認された。本研究成果は Lipid transfer protein が核内のリン脂

質の代謝に関与することを原生生物で初めて示した例となった。以上総合して、本研究成果は赤痢アメーバにおける LTPs の進化的特殊性、普遍性の意義を理解するのに役立つとともに、赤痢アメーバの治療・予防への応用を可能とする基盤的な成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1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 <i>Entamoeba histolytica</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Pathog	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水上 颯太
2. 発表標題 腸管寄生虫、赤痢アメーバにおける核-細胞質間の脂質輸送タンパク質の同定と特性評価
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水上 颯太
2. 発表標題 The elucidation of functional implication about lipid transfer proteins of <i>E. histolytica</i> involved nucleus-cytoplasm trafficking
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023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	渡邊 菜月 (Watanabe Natsuki) (00883323)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員 (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1件

国際研究集会 Seminar: Efficient removal of apoptotic cells during tissue injury via chimeric receptors for efferocytosis	開催年 2022年～2022年
---	--------------------

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