

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15426

研究課題名（和文）レトロマー複合体を基軸とした赤痢アメーバの病原因子輸送機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the virulence factor transport mechanism of *Entamoeba histolytica* based on the retromer complex

研究代表者

渡邊 菜月（Watanabe, Natsuki）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任研究員

研究者番号：00883323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：赤痢アメーバで多様化したレトロマー構成因子の機能解明を目指した本研究により、いくつかの構成因子特異的機能が明らかとなった。特筆すべきは、Vps35-1がレトロマーの貪食胞への動員を制御していること、Vps35-2が病原因子である分泌されたシステインプロテアーゼの活性を制御していることが明らかになったことである。また、それぞれの構成因子が異なるレトロマーのコア複合体を形成し、異なるコア複合体同士で二から四量体を形成していることである。本研究により、レトロマーの高度に複雑な複合体の構成とその異なる機能の一旦、特にVps35-1、Vps35-2が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レトロマーはパーキンソン病やアルツハイマー病の原因遺伝子であるVps35を含む複合体だが、レトロマー構成因子のisotypeの違いによる役割の違いは未だよく明らかになっていない。本研究により、レトロマー構成因子のそれぞれのisotypeによる異なる働き的一端が明らかとなったことはレトロマーの機能を明らかにするために重要である。

これを軸として、他のisotypeの機能や複合体の形成様式が明らかとなれば、赤痢アメーバのみならず、哺乳類における上記の疾病の原因解明と新規治療方法の発見に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study, which aims to elucidate the functions of retromer constituents that have diversified in *Entamoeba histolytica*, has clarified several constituent-factor-specific functions. Notably, Vps35-1 regulates the recruitment of retromers to phagocytic vesicles, and Vps35-2 regulates the activity of secreted cysteine proteases, which are virulence factors. In addition, each component forms a different retromeric core complex, and the different core complexes form dimers to tetramers. This study revealed the organization of a highly complex complex of retromers and their distinct functions, especially Vps35-1 and Vps35-2.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：赤痢アメーバ レトロマー Vps35

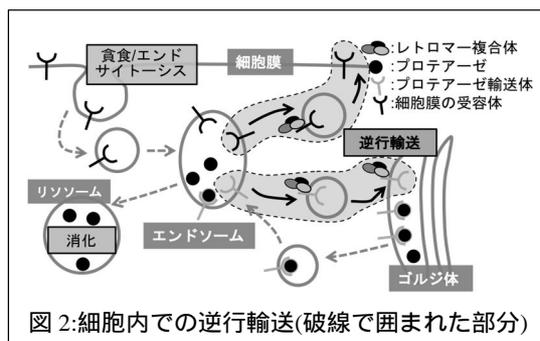
1. 研究開始当初の背景

(1) 赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)とその病原機構理解の現状

全世界人口の約 1% に感染、赤痢・肝膿瘍を起こし、年間約 10 万人が死亡する。治療薬としては、メトロニダゾールのみが唯一の選択薬剤であり、新規治療薬標的の発見が求められている。赤痢アメーバでは細胞接着・貪食・プロテアーゼ分泌が病原性の中心を担っているとされる (Labruyere & Guillen, 2006; Ralston *et al.*, Nature, 2014)(図 1)。貪食対象物のリソソームでの分解やプロテアーゼ分泌にはレトロマー複合体(レトロマー)が深く関与している(詳細は後段を参照)。

(2) 一般的なレトロマー複合体の機能

ヒトにおいてレトロマーは大きく 2 種類の経路(1. エンドソーム→ゴルジ; 2. エンドソーム→細胞膜)で多様な輸送体/受容体 (e.g., 1. プロテアーゼ輸送体; 2. グルコース・ β 2 アドレナリン・グルタミン受容体など)の逆行輸送を調節している(図 2)。そのため、レトロマーのコアタンパク質の欠損は、プロテアーゼの輸送・分泌、小胞輸送全般に異常を来し、リソソームの機能不全をもたらす。レトロマー構成因子である Vps26a, Vps35 欠損マウスは胎生致死である(Wen *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010)。ヒトの Vps35 変異は神経伝達物質の放出を障害し、パーキンソン病の原因となる (Eleuteri and Albanese, 2019)。アルツハイマー病にもレトロマーの安定性が関連している (Mecozzi *et al.*, 2014)。



レトロマー複合体コアタンパク質アイソタイプ多重性と下流シグナル: 他種生物での知見

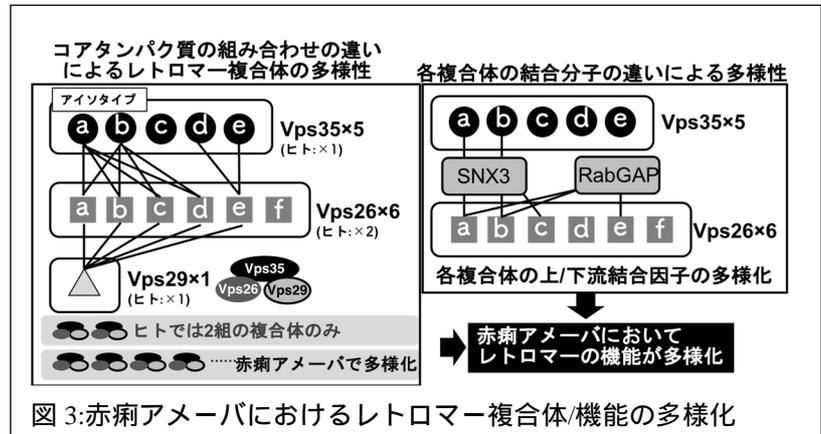
(3)

レトロマー複合体コアタンパク質アイソタイプの多重性と下流シグナル: 他種生物での知見

レトロマーは 3 つのコアタンパク質(Vps26, 29, 35)による中核(=積荷選択 中心複合体)を形成し、さらに SNX [PX domain(リン脂質結合)]と Rab7 (低分子量 GTPase)などと結合することで機能する(P.4 の図 4)。多くの生物ではレトロマーの上記コア構成因子は各々 1 種類だが、一部の動物・植物・原虫では複数の isotype が存在する(ヒト Vps26 \times 2; シロイヌナズナ Vps26 \times 2, Vps35 \times 3)。ヒトに存在する 2 種類の Vps26a/b は異なるタンパク質(TBC1D5/GOLPH3 や CI-M6PR)と選択的に結合することが知られる。Vps26a のみ胎生致死である(Bugarcic *et al.*, 2011)。しかし一般に isotype の違いによる機能の相違はほとんど知られていない。

(4) 赤痢アメーバにおけるレトロマー複合体の多様化について

申請者のゲノム探索の結果、赤痢アメーバでは**コアタンパク質の多様化**が見られた[Vps35×5個(a-e), Vps26×6個(a-f), Vps29×1個]。双方向的免疫沈降実験の結果、レトロマー形成時に幾つかの組み合わせが存在することが示された(図3左)。また、SNX3(PX domain タンパク質、種特異的)が Vps35a, b と Vps26a-c を含む複合体に、Rab-GAP(Rab 活性化タンパク質)が Vps26a, b, e を含む複合体のみと選択的に結合することが明らかとなった(図3右)。同時にレトロマーは250-700 kDaの少なくとも4種類の大きさの複合体を形成することを確認している。以上、レトロマーが複数種存在し、異なる機能を持つことを示唆している。



2. 研究の目的

赤痢アメーバのレトロマーの構造と機能の多様性を解明する。 コアタンパク質 Vps26, 35 の各 isotype の生理的役割(e.g., 運搬する積み荷、経路)の相違を解明する。また Vps26, 35 の各 isotype に結合する**新規タンパク質**(e.g., PX domain タンパク質や Rab-GAP)の**機能を解明し、レトロマー全体としての構造、多層的制御、病原機構への関与を明らかにする。**

3. 研究の方法

(1). コアタンパク質(Vps26,29,35)の遺伝子抑制株を用いた各レトロマー構成因子の機能の解明

コアタンパク質の各 isotype (Vps35a-e, Vps26a-f, Vps29)の発現抑制株を antisense small RNA による gene silencing 法で作成する。BlueNative-PAGE を行い、複合体の有無やサイズの変化によりコアタンパク質の各 isotype の複合体形成における役割を明らかにする(各 isotype が 250-700kDa の複数の複合体を形成することを既に野生株で確認)。Vps26a,b と Vps35a の関与が示された(Nakada-Tsukui *Mol Biol Cell* 2005)リソソーム酸性化やプロテアーゼ分泌等への影響を検証する。

(2). 新規 SNX の脂質結合特異性と局在解析

免疫沈降によりコアタンパク質 isotype 特異的結合(Vps35a,b; Vps26a-c; Vps29 のみ)が確認された SNX3(図3, EHI_064590)には、phosphatidyl 3-phosphate (PI3P)への結合が知られる PX domain が存在し、このレトロマー(α)を選択的に、PI3P 依存的にエンドソームに動員することが予測される。HA, GFP 標識付加した SNX3 を発現する赤痢アメーバ株を樹立する。任意の脂質を固相化したニトロセルロース膜に前述の抽出液を反応させ、抗 HA(又は GFP)抗体で検出し SNX3 の脂質特異性を確認する。GFP-SNX3 発現株を用いたライブイメージングによりプロテアーゼ輸送・エンドサイトーシス・貪食・咀嚼食における関与(Watanabe *Cell Microbiol* 2020)を時空間分解的に予測する。SNX3 発現抑制株を用いて、SNX3 発現抑制株における Vps26-35 各 isotype の局在と上記表現型を観察し、生理的役割を再検証する。

(3). 特異的レトロマー複合体結合 Rab-GAP が不活性化する Rab の特定

2 と同様に、低分子量 GTPase Rab-GAP(不活化因子, EHI_169850)はコアタンパク質 isotype のう

ち、Vps26a,b,e のみへの結合により同定された(図 3)。Rab は真核生物に普遍的に保存される小胞輸送の主要な調節因子である。Rab-活性化因子(GEF)により活性化され下流のエフェクターを動員し、Rab-GAP により不活性化される。赤痢アメーバには 100 以上の Rab(ヒトの 2 倍)と 40 以上の Rab-GAP が存在することからも Rab は本原虫の膜輸送を中心的に制御すると言える。この Rab-GAP が制御する Rab を同定するため、HA 又は BioID 標識を付加した Rab-GAP を発現する赤痢アメーバ株を作成し、免疫沈降または近接依存性ビオチン化標識法により相互作用タンパク質の同定を行い、2 と同様の手法でこのレトロマー(β)の局在と病原機構への関与を検証する。

4 . 研究成果

それぞれの isotype に HA タグをつけて、赤痢アメーバ内に発現させ、免疫沈降と BN-PAGE を行なった。その結果、レトロマーは異なる構成因子により、異なる trimer を形成することが明らかとなった。また、その trimer が dimer, trimer, tetramer などの super complex を形成することも BN-PAGE の結果から明らかとなった。免疫沈降したサンプルを MS 解析した結果、isotype ごとに異なるエフェクタータンパク質と結合することも明らかとなった。それぞれの super complex は、異なるエフェクターと結合することで、異なる機能を持つことが示唆された。

また、HA タグ付きタンパク質の発現株において、細胞内/細胞外のシステインプロテアーゼの活性を測定した。その結果、Vps35-b の過剰発現でのみ、細胞内/細胞外のシステインプロテアーゼの活性が上昇した。

さらに、Vps35-a または Vps35-b 遺伝子発現抑制株において、Vps26-a/b の phagosome, trogosome への局在化を観察した結果、Vps35-a 遺伝子発現抑制株でのみ、Vps26-1/2 の phagosome, trogosome への動員が阻害された。

これらの結果は、Vps35 が isotype ごとに異なる役割を持つことを示している。

HA-SNX3 発現赤痢アメーバ株を樹立し、その局在を観察した結果、HA-SNX3 は Vps26 と小胞の膜上ではなく、細胞質内で Vps26 が凝集した部分で共局在することが明らかとなった。

また、HA-RabGAP 発現赤痢アメーバ株を樹立し、その局在を確認したところ、HA-RabGAP の局在も小胞膜上ではなく、細胞質全体と、dot 状の小さな凝集体に局在していた。部分的に Vps26 との共局在が確認できた。

これらの結果から、SNX3 と RabGAP はレトロマーの機能に必要である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Das Koushik, Watanabe Natsuki, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 17
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 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1009551 ~ 1009551
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 -

1. 著者名 Watanabe Natsuki, Nakada-Tsukui Kumiko, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 83
2. 論文標題 Diversity of phosphoinositide binding proteins in <i>Entamoeba histolytica</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102367 ~ 102367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.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 Watanabe Natsuki, Nakada-Tsukui Kumiko, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular Dissection of Phagocytosis by Proteomic Analysis in <i>Entamoeba histolytica</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 379 ~ 379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes14020379	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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