

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15427

研究課題名（和文）赤痢アメーバをモデルとした寄生虫ポリアミン生合成経路の新展開

研究課題名（英文）New Developments in the Parasitic Polyamine Biosynthetic Pathway Using *Entamoeba histolytica* as a Model

研究代表者

Jeelani Ghulam (Jeelani, Ghulam)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：60468519

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）：このプロジェクトでは、*Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) のポリアミン生合成経路に関わる2つの酵素を精製し、特性評価しました。遺伝子サイレンシングとメタボローム解析を行い、寄生虫の生存に必要なポリアミン経路酵素を特定しました。この酵素はヒトには存在せず、新しい薬剤のターゲットとして考えられています。研究の目的は、この酵素を標的とした寄生虫の増殖を阻害する新しい薬剤を見つけることです。また、昨年度には1件の原稿を出版し、5件の共著を執筆しました。さらに、2つの原稿が現在審査中であり、データを編集し、投稿準備中です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Our research on drug development against protozoan parasites is significant. I identified enzymes crucial for parasite survival, potentially leading to new treatments. Socially, this work addresses global health challenges, offering new compounds to improve treatments and reduce disease burden.

研究成果の概要（英文）：In this project, we purified and characterized two enzymes involved in the polyamine biosynthesis pathway in *E. histolytica*. We conducted gene silencing and metabolome analysis of the polyamine biosynthesis pathway enzymes (Ornithine decarboxylase and a novel decarboxylase) in *Entamoeba histolytica*. We identified one polyamine pathway enzyme essential for parasite survival, which lacked a human homologue, making it a novel drug target candidate. We are optimizing a high-throughput screening assay against the novel decarboxylase identified in this study, aiming to find inhibitors that target this essential enzyme and inhibit the growth of the parasite.

In the last fiscal year, we published one manuscript and co-authored five manuscripts. Additionally, two manuscripts, one related to the Riboflavin pathway and the other related to the hexosamine biosynthesis pathway in *E. histolytica*, are currently under review. We are now compiling the data and preparing the manuscript for submission.

研究分野：Parasitology

キーワード：Entamoeba histolytica polyamine pathway Protozoan Parasite Metabolism Drug development

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 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は、大腸炎、赤痢、肝膿瘍を引き起こす原虫です。世界保健機構 (WHO) は、赤痢アメーバ感染による年間死者数を約 7 万人と報告しており、これは熱帯熱マラリアに次ぐ 2 番目の死亡原因とされています。日本では、この病気は 5 類感染症として分類され、特に男性同性愛者や知的障害者に多く見られます。現在、赤痢アメーバ症の治療にはメトロニダゾールやその類似体を使用されています。しかし、この薬剤に対する耐性株は臨床例からはまだ確認されていないものの、散発的に治療に対する抵抗例が報告されています。さらに、実験室内の試験 (in vitro) では、赤痢アメーバが治療レベルの薬剤濃度に容易に適応し、耐性を獲得することが示されています。このため、新しい抗赤痢アメーバ薬の開発が急務です。新しい薬剤を開発するためには、赤痢アメーバ特有の代謝経路とそれに関与する酵素の同定が不可欠です。

プトレッシン、スペルミジン、スペルミンなどのポリアミンは、2 つ以上のアミノ基を有する低分子化合物です。ポリアミンは細胞内に普遍的に存在し、生理的条件下で完全にプロトン化されて正電荷を持ちます。この正電荷により、RNA、DNA、ATP、特定のタンパク質やリン脂質と相互作用し、細胞の成育・増殖に重要な役割を果たしています。ポリアミン代謝経路は赤痢アメーバを含めた真核生物の中で多様に变化しており、その重要性にもかかわらず未解明な点が多く残されています。

### 2. 研究の目的

赤痢アメーバや他の寄生原虫のゲノムには、S-アデノシルメチオニン脱炭酸酵素、スペルミジンシンターゼ、スペルミンシンターゼなど、他の生物でポリアミン生合成に関与する酵素の相同遺伝子が存在しない。そのため、赤痢アメーバには古典的なポリアミン代謝経路が欠如していると考えられてきました。スペルミジンはタンパク質翻訳開始因子 eIF5A のリジン残基をデオキシハイプシンへと翻訳後修飾する際に使用されます。デオキシハイプシン合成酵素の発現を抑制された赤痢アメーバでは生育阻害が起こり、同 eIF5A のハイプシン化と基質であるスペルミジンの合成がアメーバの生育に必須であることが判明しました。申請者らのメタボローム解析によれば、増殖中の赤痢アメーバ栄養型にはスペルミン、スペルミジン、ノルスペルミジン、N8-アセチルスペルミジンなどのポリアミンが豊富に存在し、嚢子化の進行に従ってこれらが劇的に減少することが見いだされました。また、アスパラギン酸セミアルデヒドとジアミンからトリアミン(スペルミジン・ノルスペルミジン)を生合成する新規ポリアミン合成経路の可能性が示唆されました。これらの知見から、赤痢アメーバは人とは異なる反応経路や新規酵素によってポリアミン生合成を行っていると考えられます。しかし、赤痢アメーバのポリアミン生合成および代謝経路、生理機能の詳細は未解明であり、その解明が待たれています。

### 3. 研究の方法

- (1) メタボロミクス/質量分析による新規代謝産物の同定と代謝経路の確定: 安定同位体で標識されたポリアミン前駆体、L-メチオニン、L-アスパラギン酸、L-アルギニン、L-プトレッシンを添加した標準培地で赤痢アメーバを 0, 0.5, 3, 9, 24 時間培養し、代謝物をメタノール/クロロホルムで抽出する。抽出した代謝物をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置 (CE-TOFMS) に供試し、安定同位体標識された代謝物の分析を行う。Analyst QS softwareにてデータ解析を行い、ポリアミン生合成中間代謝産物を同定することによって代謝経路を確定する。従来の代謝中間体でなく、新規中間体の検出 (non-targeted metabolomics) を重視する。(2021年度)
- (2) 新規ポリアミン生合成酵素の精製・同定: 各種のタンパク質分画法 (塩析、各種クロマトグラフィ、分画遠心など) を用いて、赤痢アメーバの細胞破碎液からポリアミン生合成の複数の段階を触媒する酵素 [先行研究から新規合成経路を触媒すると想定される、アスパラギン酸セミアルデヒドとジアミン (1,3-ジアミノプロパンまたはプトレッシン) からトリアミン (スペルミジン・ノルスペルミジン) を作るアミノ転移酵素と脱炭酸酵素を予測、ゲノム中に複数の候補遺伝子あり] の単離精製を行う。酵素活性の評価は、反応産物の HPLC 分析にて行う。精製タンパク質を質量分析法により解析し、ゲノムデータベースからポリアミン生合成経路酵素の遺伝子を同定する。(2021, 2022年度)
- (3) 新規ポリアミン合成系酵素組換えタンパク質の発現と精製: 大腸菌発現用にコドン最適化したポリアミン生合成経路酵素遺伝子で組換えタンパク質発現系を構築、発現させた組換えタンパク質をクロマトグラフィにより単離精製する。(2022年度)
- (4) 新規ポリアミン合成系酵素の生化学的・細胞生物学的解析: 精製された組換え体タンパク質を使用して、その生化学的性質の詳細な解析 (基質特異性、酵素学的パラメーターの決定) を行う。精製された組換え体タンパク質を使用して、これに対する抗体を作製する。得られた抗体を用いて赤痢アメーバ細胞の免疫染色を行い、新規ポリアミン合成酵素の細胞内局在

を検討する。(2023年度)

- (5) 新規ポリアミン合成系酵素の生理機能の解明: antisense small RNAによる転写発現抑制によって新規ポリアミン合成系酵素遺伝子の発現を抑制した赤痢アメーバ株を作製し、その表現型(細胞内ポリアミンの濃度、タンパク合成効率、増殖速度、細胞分化の効率、ヒト細胞への障害性など)の変化を解析する。(2023年度)

#### 4. 研究成果

私たちは、*Entamoeba histolytica* におけるポリアミン経路酵素である2つの酵素(オルニチン脱炭酸酵素と新規脱炭酸酵素)の精製および組換えタンパク質の生産を行いました。これら2つの酵素の特性解析を完了しました。また、いくつかのポリアミン阻害剤(メチルオルニチン、ジアミノプロパン、ジフルオロメチルオルニチン)が赤痢アメーバの成長に及ぼす影響を調査しました。

疎水性(ブチル-トヨパール)および陰イオン交換(MonoQ)カラムを使用したタンパク質精製プロトコルを最適化し、HPLCを用いた酵素アッセイ(スベルミジンシンターゼ)を開発しました。しかし、アメーバ溶解物中の酵素活性を確認することはできませんでした。

この研究で同定されたポリアミン生合成経路酵素(オルニチン脱炭酸酵素と新規脱炭酸酵素)の遺伝子サイレンシングを *Entamoeba histolytica* で実施し、そのメタボローム解析を行いました。新規ポリアミン経路酵素の発現がエピジェネティックな遺伝子サイレンシングによって抑制されるトランスフォーマントの作成を試みましたが、失敗しました。この結果は、この遺伝子が必須であることを示唆しています。

しかし、このプロジェクトにおいて、寄生虫の生存に必須な新規ポリアミン経路酵素を1つ特定しました。この酵素はヒトの相同酵素が存在しないため、新規薬剤ターゲット候補として浮上しました。現在、我々はこの研究で同定された新規脱炭酸酵素に対するハイスループットスクリーニングアッセイを最適化しており、この必須酵素を標的とし、寄生虫の成長を阻害する阻害剤の発見を目指しています。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 14件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Hiroki, Iwasaki Arihiro, Ebihara Akira, Taguchi Raimu, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi, Suenaga Kiyotake	4. 巻 25
2. 論文標題 Isolation of Hennaminal and Isolation and Total Synthesis of Hennamide, Pyrrolinone Compounds from the Marine Cyanobacterium Rivularia sp.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 2400 ~ 2404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.3c00421	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 Lozano-Mendoza Janeth, Ramirez-Montiel Fatima, Rangel-Serrano Angeles, Paramo-Perez Itzel, Mendoza-Macias Claudia Leticia, Saavedra-Salazar Faridi, Franco Bernardo, Vargas-Maya Nauru, Jeelani Ghulam, Saito-Nakano Yumiko, Anaya-Velazquez Fernando, Nozaki Tomoyoshi, Padilla-Vaca Felipe	4. 巻 12
2. 論文標題 Attenuation of In Vitro and In Vivo Virulence Is Associated with Repression of Gene Expression of AIG1 Gene in Entamoeba histolytica	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 489 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens12030489	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 Kadri Samia, Nakada-Tsukui Kumiko, Watanabe Natsuki, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 PTEN differentially regulates endocytosis, migration, and proliferation in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 1010147 ~ 1010147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010147	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 Taguchi Raimu, Iwasaki Arihiro, Ebihara Akira, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi, Suenaga Kiyotake	4. 巻 24
2. 論文標題 Isolation and Total Synthesis of Beru' amide, an Antitrypanosomal Polyketide from a Marine Cyanobacterium Okeania sp.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4710 ~ 4714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c02013	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 Ishiwara David Guillermo Perez, Shibayama Mineko, Nakada-Tsukui Kumiko, Jeelani Ghulam, Gomez-Garcia Maria del Consuelo, Flores Olivia Medel, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Transcriptome Analysis of Entamoeba histolytica Trophozoites during in vivo Contact-independent Mediated Host-parasite Interaction: Putative Pathways Related to PCD	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Research Journal International	6. 最初と最後の頁 42~62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.9734/mrji/2022/v32i530390	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 Nugraha Rivo Yudhinata Brian, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 press
2. 論文標題 Physiological roles and metabolism of $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in parasitic protozoa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Trends in Parasitology	6. 最初と最後の頁 press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pt.2022.02.004	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 Peng Ruofan, Yoshinari Shigeo, Kawano-Sugaya Tetsuro, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification and Functional Characterization of Divergent 3'-Phosphate tRNA Ligase From Entamoeba histolytica	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 746261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.746261	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 Iwasaki Arihiro, Teranuma Kazuya, Kurisawa Naoaki, Rahmawati Yulia, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi, Gerwick William H., Suenaga Kiyotake	4. 巻 84
2. 論文標題 First Total Synthesis and Structure Activity Relationship of Iheyamide A, an Antitrypanosomal Linear Peptide Isolated from a Dapis sp. Marine Cyanobacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2587~2593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00792	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 Ebihara Akira, Iwasaki Arihiro, Miura Youhei, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi, Suenaga Kiyotake	4. 巻 86
2. 論文標題 Isolation and Total Synthesis of Bromoiesol sulfates, Antitrypanosomal arylethers from a Salileptolyngbya sp. Marine Cyanobacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 11763 ~ 11770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c01214	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 Kurisawa Naoaki, Otomo Keisuke, Iwasaki Arihiro, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi, Suenaga Kiyotake	4. 巻 86
2. 論文標題 Isolation and Total Synthesis of Kinenzoline, an Antitrypanosomal Linear Depsipeptide Isolated from a Marine Salileptolyngbya sp. Cyanobacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 12528 ~ 12536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c00817	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 Jeelani Ghulam, Balogun Emmanuel Oluwadare, Husain Afzal, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Glycerol biosynthetic pathway plays an essential role in proliferation and antioxidative defense in the human enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-40670-z	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 Umeda Kairi, Iwasaki Arihiro, Taguchi Raimu, Kurisawa Naoaki, Jeelani Ghulam, Nozaki Tomoyoshi, Suenaga Kiyotake	4. 巻 86
2. 論文標題 Isolation and Structure Determination of Akunolides, Macrolide Glycosides from a Marine Okeania sp. Cyanobacterium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2529 ~ 2538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.3c00742	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 Usman Mahmud, Nataala Audu Joseph, Jatau Isa Danladi, Ogo Ndudim Isaac, Jeelani Ghulam, Goto Yasuyuki, Nozaki Tomoyoshi, McKerrow James H., Balogun Emmanuel Oluwadare	4. 巻 13
2. 論文標題 Molecular identification of phlebotomine sand flies and the harbored Leishmania spp. in Sokoto State, Nigeria	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1219629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2023.1219629	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 Takahashi Hiroki, Iwasaki Arihiro, Kurisawa Naoaki, Suzuki Ryota, Jeelani Ghulam, Matsubara Teruhiko, Sato Toshinori, Nozaki Tomoyoshi, Suenaga Kiyotake	4. 巻 84
2. 論文標題 Motobamide, an Antitrypanosomal Cyclic Peptide from a Leptolyngbya sp. Marine Cyanobacterium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1649 ~ 1655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00234	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

〔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
---------	---------