

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19372

研究課題名（和文）原虫核からヒト細胞核へ移行する新規宿主制御因子の解明

研究課題名（英文）Role of KERP2 as a potential regulator in *Entamoeba histolytica* and the human host

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：赤痢アメーバ内では KERP2が主に核、特に核小体に局在することが示された。核への局在シグナルはタンパク質の後半部分に存在した。KERP2は細胞外に放出され、Caco-2細胞に取り込まれる。KERP2発現抑制株との比較RNA seq解析により、KERP2のリボソームの生合成への関与が示された。KERP2発現抑制株とCaco-2細胞との共培養後の免疫沈降法により、KERP2とタイトジャンクション構成タンパク質やアクチン・ミオシン制御タンパク質との結合が示された。KERP2発現抑制株と野生型株との共培養後のRNA seq解析により、KERP2により制御されるヒト側遺伝子と経路が特定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以上の赤痢アメーバのKERP2に関する研究成果は、腸管内寄生原虫が、液性因子を放出して、宿主の細胞・組織に作用し、その機能や遺伝子発現をどのように修飾・制御するかを示す世界で初めての画期的な成果を提供したと言える。

研究成果の概要（英文）：*Entamoeba histolytica* is a parasitic protist that heavily depends on parasite-host interactions. A comprehensive understanding of the proteins that mediate parasite-host interactions is essential for decoding this parasite's pathogenicity. A recently identified lysine and glutamic acid-rich proteins (KERPs) are known to interact with the brush border of human intestinal cells. In this study we investigated functional role of KERP2, by employing strategies such as epitope-tagging, gene silencing, and multi-omics. Our data suggest that KERP2 functions as a gene repressor, controlling ribosome biogenesis in the parasite. We also note that KERP2 exhibits translocation from the parasite to the enterocytes. We identified a panel of proteins that bound to KERP2 in Caco-2 cells. Furthermore, we also found that a set of genes from several pathways were regulated by KERP2 in humans.

研究分野：寄生虫学、感染症学、病原学

キーワード：原虫 宿主制御 分泌 核移行

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

ウイルスや細菌・原虫などでは細胞内寄生体で知られている分泌装置やエフェクターを特殊に新規創生したり既存の分子を利用して宿主機能を調節することが知られている。一方で細胞外寄生体ではこれらの宿主調節機構はほとんど理解されていない。感染におけるウイルス、細胞内寄生性細菌・原虫などによる細胞内寄生の過程において、病原体は多彩な方法により宿主の核酸・アミノ酸・脂質等の合成機構を乗っ取り、同時に宿主による排除を抑圧し、寄生の成立を計る。ウイルスや細胞内細菌 (I-VII 型分泌装置による) のエフェクター分子による宿主の制御・修飾はよく知られる。細胞内寄生性原虫においても、免疫抑制 (e.g., トキソプラズマの GRA15 による宿主一酸化窒素産生活活性化による免疫抑制; リーシュマニアによる好中球のアポトーシスの抑制とマクロファージによる静かな貪食)・小胞輸送攪乱 (e.g., クルーズトリパノソームによるファゴソームからの脱出)・分子煙幕による攪乱 (e.g., マラリア SERA による免疫回避) などにより、宿主の機能を修飾・制御することが知られている。一方、細胞に侵入することのない細胞外寄生性原虫においては、特に血液や組織に寄生しない腸管内寄生原虫 (e.g., 赤痢アメーバ) に関しては、原虫がどのように宿主の細胞・組織、更に免疫に対して修飾・制御を行うかは全く理解されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、腸管寄生性原虫赤痢アメーバを研究対象とし、核内因子で、ヒト細胞との接触により放出され、ヒト細胞に取り込まれ核移行する Lysine glutamic acid rich protein (KERP2) の宿主移行とヒトに対する生理作用を分子レベルで解明することを目的とする。大腸腔内に寄生し、ヒト細胞の貪食・分解を病原性の特徴とする赤痢アメーバにおいては、“細やかな” 宿主制御機構をもつ必要はないと考えられていた。赤痢アメーバは核内タンパク質 KERP2 をヒト細胞との接触到に依存的に放出し、宿主の機能を修飾することが準備的成果により示されている。本研究は、これまで宿主に対して高次元で宿主機能を修飾することが知られていなかった細胞外寄生性原虫の感染において、原虫に分泌されるタンパク質が宿主に移行し、宿主の機能を修飾することを示す成果を生み出すことが期待された。

### 3. 研究の方法

KERP2 の細胞内局在と腸管・免疫系の標的細胞を特定するために、標識付加した KERP2 を発現する形質転換体を作成し、分子生物学的、細胞生物学的、生化学的アプローチを駆使して、細胞内局在と動態を明らかにする。Caco-2 細胞 (大腸癌) を用い、KERP2 発現による全遺伝子発現への影響を RNA-seq により解析する。antisense small RNA を用いた遺伝子発現抑制法 (gs) により作成した KERP2 発現抑制赤痢アメーバ株 (KERP2gs 株) を用いて、上記の 2 種の培養細胞と KERP2gs 株を共培養し、ヒト細胞の全遺伝子発現像への効果を明らかにした。更に、KERP2 の宿主制御因子としての可能性を検証すべく、タンパク質相互作用を起こす分子をヒト細胞と赤痢アメーバの両方から同定する。KERP2 の標識は HA タグや GFP (緑色タンパク質) の付加により、形質転換体を作成して行なった。KERP2 はコイルドコイル、核移行・脱出配列をもつため、それぞれの領域の欠損変異体を融合タンパク質として発現する形質転換株を発現する赤痢アメーバを作成し、原虫・ヒト細胞内での局在・動態を観察し、各領域の機能を解析した。また、これらの標識付加 KERP2 の過剰発現体、並びに、gene silencing 法による遺伝子発現抑制体の作出により、宿主への KERP2 の移行、KERP2 の赤痢アメーバ病原機構への影響、KERP2 のヒト細胞への影響を明らかにすることを目指した。

### 4. 研究成果

KERP2 はリジンとグルタミン酸に富んだタンパク質であり、先行研究により、ブラッシュボードに結合するタンパク質を網羅的に獲得するオミクス解析から発見された KERP1 と似た物性を持っていることが予想されるが、その細胞内での挙動や生理的機能は全く未知であった。我々はまず、その細胞内局在を明らかにするために、KERP2 の標識付加体の発現体を作成した。間接蛍光抗体法やライブイメージング解析により、KERP2 は赤痢アメーバの細胞内では主に核に局在すること、更に、核小体 nucleolus に局在することが示された。核への局在シグナルをタンパク質の分割と部分的な発言により確認したところ、核局在シグナルはタンパク質の C 末端後半部分に存在することが示された。更に、HA-KERP2 を発現する形質転換体を用いて、KERP2 は赤痢アメーバの核から脱出し、更に細胞外に放出されることが示された。更に細胞外に放出された後、Caco-2 (ヒト大腸がん由来) を始めとするヒト細胞に取り込まれることが示された。KERP2 遺伝子抑圧 (gene silencing 法による) 株との比較トランスクリプトーム (RNA seq) 解析により、KERP2 はリボソームの生合成や rRNA のプロセッシングに関与していることが示唆された。また、KERP2 gene silencing 株と Caco-2 細胞との共培養後のアフィニティ免疫沈降法により、HA-KERP2 がタイトジャンクションのタンパク質やアクチン・ミオシンの制御に関与するタンパク質と結合することが示された。また、KERP2 gene silencing 株と野生型株との共培養後の RNA seq 解析

により、KERP2 により制御されるヒト側遺伝子と経路が特定された。以上の成果は、腸管内寄生原虫が、液性因子を放出して、宿主の細胞・組織に作用し、その機能や遺伝子発現をどのように修飾・制御するかを示す画期的な成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Peng, R., Santos, H. J., Nozaki, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Transfer RNA-derived small RNAs in the pathogenesis of parasitic protozoa.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes (Basel).	6. 最初と最後の頁 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13020286.2022	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

1. 著者名 Santos, H. J., Hanadate, Y., Imai, K., Watanabe, H., Nozaki, T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Entamoeba histolytica EHD1 is involved in in mitosome-endosome contact	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0384921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.03849-21.	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 該当する

1. 著者名 Nakada-Tsukui, K., Watanabe, N., Shibata, S., Whayuni, R., Miyamoto, E., Nozaki, T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Proteomic analysis of Atg8-dependent recruitment of phagosomal proteins in the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica,	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Cel Inf Microbiol	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2022.961645.	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

1. 著者名 Kadri S, Nakada-Tsukui K, Watanabe N, Jeelani G, Nozaki T.	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 Pathog.	6. 最初と最後の頁 e1010147
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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Herbert Santos
2. 発表標題 A possible role of exosomal hydrolase receptors in the pathogenesis of the human intestinal parasite <i>Entamoeba histolytica</i>
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下山 真怜
2. 発表標題 A Rho small GTPase which negatively regulates endocytosis in <i>Entamoeba histolytica</i> is involved in vesicular trafficking
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Herbert J. Santos and Tomoyoshi Nozaki
2. 発表標題 A possible role of exosomal hydrolase receptors in the pathogenesis of the human intestinal parasite <i>Entamoeba histolytica</i> .
3. 学会等名 15th International Conference of Parasitology, Copenhagen
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Herbert J. Santos and Tomoyoshi Nozaki:
2. 発表標題 A possible role of exosomal hydrolase receptors in the pathogenesis of the human intestinal parasite <i>Entamoeba histolytica</i> .
3. 学会等名 US-Japan Medical Sciences Program, Manila,
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	津久井 久美子  (Tsukui Kumiko)  (00420092)	国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官   (82603)	
研究 分担者	サントス ハルベルト・ヒメネス  (Santos Herbert Jimenez)  (90793779)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教   (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
---------	---------