

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月25日現在

機関番号：17201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890136

研究課題名（和文）赤痢アメーバにおける新規病原性因子“含硫脂質”の病原機構の解明

研究課題名（英文）The functional analysis of *Entamoeba* sulfolipids研究代表者 見市（三田村） 文香（MI-ICHI FUMIKA）  
佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：70576818

## 研究成果の概要（和文）：

赤痢アメーバのミトコンドリア残存オルガネラ“マイトソーム”の主たる機能が sulfate activation pathway であることを過去に報告している。しかしながらその生理的意義は不明であった。本研究において、赤痢アメーバの硫酸活性化経路が原虫の増殖にとって必須であること、chlorate が赤痢アメーバ硫酸活性化経路の第一酵素である ATP sulfurylase の阻害剤であることを見出した。今後マウス感染モデルでの赤痢アメーバへの chlorate の作用の解析へと発展させることで、赤痢アメーバの新規病原性因子の解明を行いたい。

## 研究成果の概要（英文）：

Although the sulfate activation pathway is the major function in *E. histolytica* mitosomes, their physiological role remains unknown. In this study, I examined the phenotypes of the parasites in which genes involved in the mitosome functions were suppressed by gene silencing, and showed that sulfate activation in mitosomes is important for sulfolipid synthesis and cell proliferation. Furthermore, I found that chlorate (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>) inhibited cell growth of *E. histolytica* (IC<sub>50</sub>=10.5 mM). The importance and topology of the components in *E. histolytica* mitosomes reinforce the notion that they are not "rudimentary" or "residual" mitochondria, but represent a uniquely evolved crucial organelle in *E. histolytica*.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

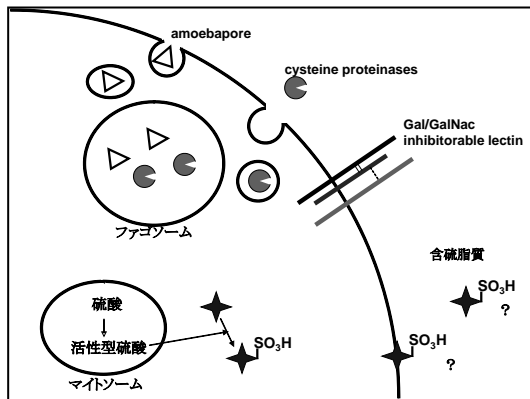
科研費の分科・細目：寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：赤痢アメーバ・マイトソーム・硫酸活性化経路・含硫脂質・chlorate

## 1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバは大腸に寄生して赤痢を起こす原虫である。赤痢アメーバ症は赤痢アメーバの腸管感染によって起こり世界全人口の1%が罹患する重要な感染症である。わが国におい

ても知的障害者や男性同性愛者などにおいて高い感染を引き起こす。更に近年では異性間性行为による感染の危険性が高まっている。臨床で用いられる薬剤も一剤のみであり新規



薬剤開発が危急の課題である。

赤痢アメーバは、大腸内で粘膜上皮細胞に接着し、これを破壊し、組織内に寄生する。時に腸管外に播種して、肝臓・肺・脳などに寄生し、重篤な症状を引き起こす。赤痢アメーバの感染成立には、様々な因子が関わっている。

- (1) 腸管上皮細胞への接着 (Gal/GalNac inhibitorable lectin)
- (2) 病原因子である組織融解性物質 (amoebapore) の分泌
- (3) 分解された哺乳動物組織を貪食・分解 (cysteine proteinases)

これら3タイプの因子が、主たる病原因子として同定されており、これら3つの因子を同時にノックダウンした原虫は、宿主(マウスモデル)への感染力が低下することが報告されている。(Mirelman D. et al., 2008)

しかしながら、実際の病原性は複雑であり、人による症状の違い(一部の人に起こる重篤化、また半数以上が不顕性感染)や重篤化のメカニズムについては上記3つの因子のみでは説明することは出来ず、別の因子(原虫側、宿主側)が症状の違いを規定している可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究は、原虫側の新たな病原因子の探索、およびそれに対する宿主側の応答の解析を行ない、赤痢アメーバの病原機構の一端を解明することを目的としている。

原虫側の新たな病原因子の1つの候補として、硫酸活性化経路により合成される、含硫脂質を考えている。申請者は、これまで赤痢アメーバのミトコンドリア関連オルガネラであるマイトソームの生化学的な解析を行ない、マイトソームの主たる機能が硫酸活性化経路であることを明らかにした(Mi-ich iet al., 2009)。

- (1) 硫酸活性化経路は通常ミトコンドリアには存在しない(通常は細胞質か葉緑体)
- (2) 赤痢アメーバが、進化の過程で独自に獲得した

- (3) 進化的に近縁の自由生活性アメーバ(*Mastigamoeba balamuthi*)にはマイトソームはあるが、硫酸活性化経路はない

このことから、赤痢アメーバが寄生適応する過程で硫酸活性化経路を獲得した可能性が高い。

そして、硫酸活性化経路で活性化された硫酸は、脂質に転移され含硫脂質となる。原虫内での含硫脂質の機能は不明であるが、含硫脂質は細菌で病原性を決める因子として知られており、赤痢アメーバでも同様に病原性に関わる可能性がある。

現在所属する研究室では、寄生性原虫の感染実験の系が確立している。また免疫系因子のノックアウトマウス株を多数保有しており、宿主免疫応答と原虫感染の解析が可能である。これまで申請者が培った原虫側の解析とノックアウトマウスの解析を組み合わせることで、赤痢アメーバの新規病原因子を見出し、宿主応答を含めたより詳細な病原機構を解析できると考えている。

## 3. 研究の方法

以下の3点を明らかにすることで、赤痢アメーバ感染成立のメカニズムを明らかにする。

### 1 発現抑制原虫の作製とマウス感染モデルの構築

Mirelman らにより報告された Gene silencing 法をマウス感染モデルに導入する。この Gene silencing 法は、特殊な培養株でのみ起こる発現抑制であり、この培養株のマウスへの定着が不可欠である。一度培養に導入した赤痢アメーバは、病原性が著しく低下してしまう。今回、短い期間で継代的に感染させる、免疫不全マウスを用いる、などの方法を用いて、発現抑制原虫のマウス感染モデルを確立する。そして、硫酸活性化経路の発現抑制株を作製する。

### 2 含硫脂質の病原性の評価

含硫脂質の病原性の評価を行なうため、硫酸活性化経路の発現抑制原虫および強制発現原虫(Mi-ich iet al., 2009) のマウス肝臓への感染実験を行い、病原性の評価を行なう。結核菌の研究により、含硫脂質には宿主免疫応答の抑制能があることが報告されている。一方赤痢アメーバの感染により TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  などの産生が報告されている。硫酸活性化経路の活性の違いにより、これらの産生量の変化と他の変

動する因子を解析する。

### 3 宿主免疫応答時の原虫側因子の変動解析

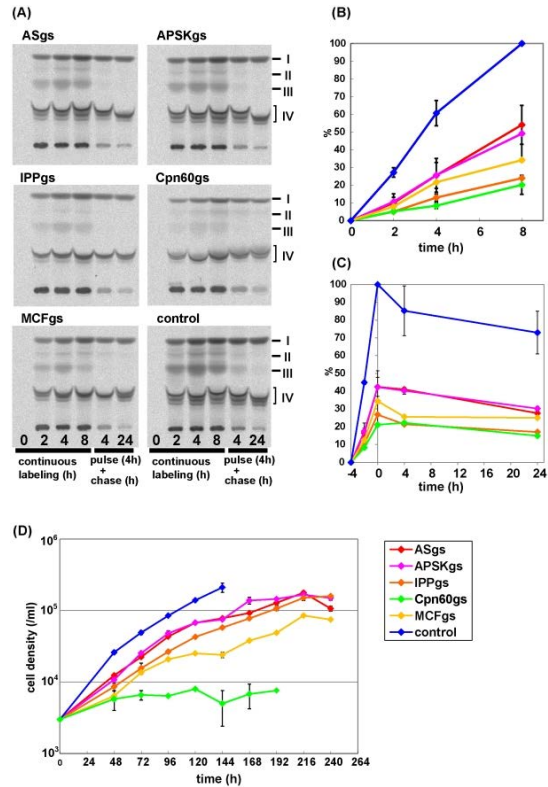
原虫が宿主に侵入した際の原虫側の応答を、野生型、原虫発現抑制株および強制発現株で解析する。原虫が宿主に侵入した際の宿主側の免疫応答は良く知られているが、原虫側も感染を成立するため同様に応答していると考えられる。原虫側の応答を解析することにより、病原機構の発現をより理解できると考えられる。

### 4. 研究成果

赤痢アメーバは典型的なミトコンドリアを持たない。代わりにマイトソームと呼ばれるミトコンドリア残存オルガネラを持つ。申請者はマイトソームの生化学的な解析を行い、マイトソームの主たる機能が硫酸活性化経路であること、最終代謝産物が“含硫脂質”であることを過去に報告している (Mi-ichi, et al. 2009 PNAS)。本研究は、マイトソームの生理的意義を明らかにするため、この“含硫脂質”が新たな病原因子として機能するかを検証し、赤痢アメーバの病原機構の解明に資する成果を挙げることを目的としている。赤痢アメーバの病原機構の解明には遺伝子改変原虫のマウス感染モデルが不可欠であると考え、22年度に遺伝子改変原虫のマウス感染モデルを構築、23年度は構築した系を用いて、病原性の評価を行うことを予定していた。マウスの系統はCBA/Jを、原虫はノックダウンが可能な培養株 (G3株) を用いた。22年度に数回の定着例を見たが、再現性が低く、原虫のマウス感染モデルとしての使用には未成熟であった。そこで本年は、遺伝子改変原虫のマウス感染モデルの構築を行いつつ、同時に別のアプローチを行った。赤痢アメーバの硫酸活性化経路の酵素をノックダウンすると、ノックダウンの程度に比例して原虫の増殖が阻害されることを見出した。さらに阻害剤を探索し、chlorateが赤痢アメーバ硫酸活性化経路の第一酵素であるATP sulfurylaseの阻害剤であること、原虫の増殖を阻害することを見出し、論文に報告した (Mi-ichi, et al. 2011 Plos. Negl. Trop. Dis)。

病原因子と期待する硫酸活性化経路の阻害剤を得たことは非常に大きな収穫であり、今後宿主体内の赤痢アメーバへのchlorateの作用を解析することで、赤痢アメーバが産生する含硫脂質の機能解析を既存のマウス感染モデルで行うことが出来るようになると考えてい

る。



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1: Mi-ichi F, Makiuchi T, Furukawa A, Sato D, Nozaki T. Sulfate activation in mitochondria plays an important role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl Trop Dis. 2011 5(8):e1263.

2: Husain A, Sato D, Jeelani G, Mi-ichi F, Ali V, Suematsu M, Soga T, Nozaki T. Metabolome analysis revealed increase in S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J Biol Chem. 2010 285(50):39160-70.

3: Yousuf MA, Mi-ichi F, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Localization and targeting of an unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. Eukaryot Cell. 2010 9(6):926-33.

[学会発表] (計9件)

1. 牧内貴志、見市文香、津久井久美子、野崎智義高度に進化した *Entamoeba* マイトソーム

におけるタンパク質輸送機構、第 81 回日本  
寄生虫学会大会 2012, 3, 23-24

2. 吉田裕樹、原博満、見市文香、リーシュマ  
ニア原虫に対する自然免疫機構の解明 第 81  
回日本寄生虫学会大会、2012, 3, 23-24

3. 原博満, 中谷真子, 見市文香, 飯笹英一,  
吉田裕樹 "Leishmania major に対する自然免  
疫機構の解析感染症若手フォーラム 2012, 2,  
2-4

4. 原博満、中谷真子、見市文香、吉田裕樹、  
リーシュマニア原虫に対する自然免疫機構  
の解明、第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22  
回日本臨床寄生虫学会大会 2011, 7, 17-18

5. 牧内貴志、見市文香、津久井久美子、野崎  
智義、Entamoeba マイトゾームにおけるタン  
パク質輸送機構の解析第 80 回日本寄生虫学  
会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会  
2011, 7, 17-18

6. 見市文香、原博満、吉田裕樹、Trypanosoma  
cruzi 感染における新規自然免疫制御分子  
CARD9 の役割の解明、第 80 回日本寄生虫学  
会大会・第 22 回日本臨床寄生虫学会大会、  
2011, 7, 17-18

7. 三田村俊秀、土井裕子、見市文香、岡田麻  
美、野崎智義、狩野繁之、嘉糖洋陸、マラリ  
ア原虫 stearyl-CoA Δ<sup>9</sup>-desaturase の役割、  
第 80 回日本寄生虫学会大会・第 22 回日本臨  
床寄生虫学会大会 2011, 7, 17-18

8. Fumika Mi-ichi、Gene silencing of  
mitosomal proteins cause growth  
inhibition suggests essentiality of  
mitosomes in Entamoeba histolytica" 45th  
Annual Japan-U.S. Joint Conference on  
Parasitic Diseases" 2011, 1, 10-12

9. 見市文香、牧内貴志、モハマド・アブ・ユ  
ースフ、赤痢アメーバ原虫 mitosome に存在  
する硫酸活性化経路の生理機能の解明、第 79  
回日本寄生虫学会大会、2010, 5, 20-21

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

見市(三田村) 文香(MI-ICHI FUMIKA)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号：70576818

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし