

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390099

研究課題名(和文) 赤痢アメーバの細胞分化の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular Basis of differentiation of *Entamoeba histolytica*

研究代表者

野崎 智義 (Nozaki, Tomoyoshi)

国立感染症研究所・寄生動物部・部長

研究者番号：60198588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 3,690,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢アメーバの嚢子モデルである *Entamoeba invadens* を用いて、嚢子化過程において、キャピラリー電気泳動飛行時間計測型質量分析計を用いたメタボローム解析、DNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行い、代謝物の動態、遺伝子発現を網羅的に解析し、高度な代謝の変化を確認した。更にこれまで未同定の新規の代謝経路を発見した。本研究成果は、遺伝子発現と代謝物の動態から代謝の流れと調節点を同定し、嚢子化の代謝変化の分子機構を理解することを可能とした。

研究成果の概要(英文)：Metabolomics and transcriptomics analyses of encystation in *Entamoeba invadens* was conducted. We demonstrated a comprehensive view of metabolisms during encystation, including several unpr edicted pathways and metabolites. These data should help us to further identify key regulatory points of gene expression and metabolic fluxes, and eventually understand elaborate regulation of entire metabolic network during encystation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学

キーワード：感染症 分化 トランスクリプトーム 寄生虫 病原性

## 1. 研究開始当初の背景

寄生適応や病原性などの原虫に不可欠な細胞機構は、一般に、個別の遺伝子・タンパク質の生化学・細胞生物学・遺伝学的解析手法、並びにゲノム〜プロテオームなどの網羅的解析手法により解析されることが多い。しかし、これらの遺伝子〜タンパク質だけを対象とした解析結果は必ずしも表現型を反映しない。一方、メタボローム解析では表現型にもっとも近い細胞内応答である代謝物の絶対量を捕えることが可能である。本研究では、腸管寄生原虫赤痢アメーバの感染伝播に不可欠な細胞分化(嚢子化)における代謝調節のネットワークを、メタボロームとトランスクリプトームの統合解析により解明することを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は以下の通りである。*Entamoeba histolytica*の嚢子モデルである*Entamoeba invadens*を用いて、嚢子化過程において、キャピラリー電気泳動飛行時間計測型質量分析計(CE-ToFMS)を用いたメタボローム解析を行い、代謝物の動態を網羅的に理解し、合成・分解経路を同定することを目的とした。更に、トランスクリプトーム解析により、転写誘導される遺伝子を時特異的に同定することとした。これにより、最終的には、遺伝子発現と代謝物の動態から代謝の流れと調節点を同定することを目指した。更に、嚢子化過程で上昇する代謝物や発現上昇する遺伝子から、嚢子化の初期のキー分子、機構を理解することを長期的な目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) メタボローム

ヘビアアメーバ*E. invadens*を用いてインビトロ嚢子化過程での代謝物抽出を行った。インビトロの嚢子化は既に応募者らにより確立された方法(Picazari Inf Immun 2008; Picazari Methods Enzymol 2008)を用い、グルコース飢餓と浸透圧低下により誘導後、0.5, 2, 8, 24, 48, 72, 128時間後の細胞をトリプリケートで採取した。CE-ToFMSは確立された方法(Husain J Biol Chem 2010)を用い、約100種の陽・陰イオン性並びに核酸性化合物の定量を行った。変動代謝物をKEGGの代謝経路にマップした。

### 2) トランスクリプトーム

上記の方法で、嚢子化過程の時系列で採取された細胞からRNAを抽出し、Affimetrixプラットフォームのカスタムアレイに既に確立した方法(Gilchrist Mol Biochem Parasitol 2006)でハイブリダイゼーションを行った。得られたデータはSAMにより統計解析し、少なくとも1点で3倍以上上昇する遺伝子を抽出する。Cluster解析により、動態により遺伝子のグルーピングを行うとともに、KEGGマップを用いて、変動遺伝子を代謝経路にマップした。

### 3) 形質転換系の作成

*E. invadens*の形質転換法を確立する。*E. histolytica*で用いられている電気穿孔法、リポフェクションなどの既存の方法を検討した。

### 4) ポリアミン代謝経路の証明とバイオジェニクアミン合成酵素の同定

嚢子化で誘導される代謝経路、特にポリアミン合成・分解経路の存在を確認するため、更に機能解明のために、細胞内外のポリアミンや誘導体を計測するアッセイ系の構築を目指した。嚢子化誘導初期に上昇するバイオジェニクアミン(Cadaverine, isobutylamine)等の合成酵素の候補遺伝子をゲノムから検索した。

## 4. 研究成果

### 1) メタボローム解析

メタボローム手法を用いて栄養型から嚢子への細胞分化の過程で起こる代謝産物の量的変化を解明した。キャピラリー電気泳動飛行時間計測型質量分析器(Capillary electrophoresis-Time of Flight Mass Spectrometry)を用いて、グルコース飢餓と浸透圧低下により赤痢アメーバの嚢子化誘導後、0.5, 2, 8, 24, 48, 72, 120時間後のメタボローム解析を行った。解糖経路・核酸・アミノ酸代謝などの中心的代謝経路だけでなく、嚢子壁合成経路・ポリアミン合成・分解経路などの中間代謝物の>100の嚢子過程の継続的プロファイリングを達成した。この解析により、嚢子化過程で解糖経路・発酵、核酸合成が止まり、グルコースからの代謝の流れが転換されていた。更に、キチンの合成経路、ポリアミンの代謝経路に關与する中間代謝物に大きな変化が観察された。誘導後速やかに、解糖経路・発酵が止まり、代謝の流れが嚢子壁合成に誘導されるていた。ポリアミン経路を経て神経伝達物質としても知られるガンマアミノ酪酸(GABA)が合成されること、嚢子化初期にバリン・イソロイシンなどから脱炭酸により嚢子化初期にアミンが合成されることが初めて示された。

2) 嚢子化過程の細胞から mRNA を抽出し、遺伝子発現プロファイリングを DNA マイクロアレイを用いて行った。この結果、全 12000 の遺伝子に関して、嚢子化過程の網羅的遺伝子発現制御様式が解明された。

3) また、*Entamoeba invadens* において遺伝子の個別機能を解明するために、形質転換法の確立を行った。LipofectAmine を用いたリポフェクションにより外来性遺伝子を発現する系を確立した。更に安定形質転換体の作成に不可欠な薬剤耐性遺伝子の選択を終えた。

4) 嚢子化で誘導される代謝経路のアッセイ型の構築と機能解明を行った。嚢子化で誘導される代謝(ポリアミン、脱炭酸化アミノ酸)の生成を調節する酵素を組換えタンパク質

として発現させた。ポリアミン代謝経路の個別の酵素を同定し、その生化学的性質を解明するためには簡便でハイスループットなアッセイ型の構築が不可欠である。誘導体化ポリアミンを吸着するカラムを用いたHPLCによるアッセイ型を構築した。嚢子化過程に上昇するバイオジェニックアミン合成酵素の機能解析を目的としてゲノムから嚢子化誘導初期に上昇するアミンの合成の分子機構をデカルボキシラーゼの候補遺伝子をゲノムから同定した。

#### 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13件)

- 1) Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., and Nozaki, T. Global Analysis of gene expression in response to L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. BMC Genomics 12, 275, 2011.
- 2) Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Sulfate activation in mitochondria plays a crucial role in the proliferation of *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1263, 2011.
- 3) Watanabe, K., Gatanaga, H., de Cadiz, A.E., Tanuma, J., Nozaki, T., Oka, S. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. PLoS Negl. Trop. Dis. 5, e1318, 2011.
- 4) Penuliar, G. M., Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Husain, A., Sato, D., and Nozaki, T. Transcriptional and functional analysis of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Chemother. 67, 375-386, 2012.
- 5) Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2045-2052, 2011.
- 6) Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Novel transmembrane receptor involved in phagosome transport of lysozymes and  $\beta$ -hexosaminidase in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. (2):PLoS Pathog., doi: /journal.ppat.1002539, 2012.
- 7) Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Cysteine protease-binding protein family 6 mediates the trafficking of amylases to phagosomes in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. Inf. Immun. 81,1820-1829, 2013.
- 8) Ali, V. and Nozaki, T. Iron sulfur clusters, their biosynthesis and biological functions in protozoan parasites. Adv. Parasitol., 83, 1-92, 2013.

- 9) Escueta- De Cadiz, A., Jeelani, G., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. Transcriptome analysis of encystation in *Entamoeba invadens*. PLoS One 8, e74840, 2013.
- 10) Makiuchi, T. and Nozaki, T. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. Biochimie 100, 3-17, 2014
- 11) Raj, D., Ghosh, E., Mukherjee, A.K., Nozaki, T., and Ganguly, S. Differential gene expression in *Giardia lamblia* under oxidative stress: Significance in eukaryotic evolution. Gene. 2013 Dec 6. doi:pii: S0378-1119(13)01574-6.
- 12) Marumo, K., Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., and Nozaki, T. Ligand heterogeneity of the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. Int. J. Parasitol. in press. 2014
- 13) Jeelani, G. and Nozaki, T. Metabolomic analysis of *Entamoeba*: applications and implications. Curr. Opin. Microbiol. 2014 in press.

[学会発表](計11件)

- 1) Nozaki, T. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. The Second Cross-Straits and Asia Pacific International Conference on Parasites, August 31-September 2, 2011, Tainan, Taiwan. (Invited lecture)
- 2) Nozaki, T. A novel import machinery of the highly divergent mitochondrion-related organelle from the anaerobic parasitic protist *Entamoeba histolytica*. International Union of Microbiological Societies. September 8-10, 2011, Sapporo, Japan. (Symposist and Convenor)
- 3) Nozaki, T. Function and transport of the highly divergent mitochondrion-related organelle from the anaerobic parasitic protist *Entamoeba histolytica*. The 1st Asian Conference of Parasitology, October 3-6, 2011, Jeju, Korea (Plenary Lecture)
- 4) Nozaki, T. A novel class of hydrolase receptors involved in the lysosomal trafficking of virulence factors in *Entamoeba histolytica*. Joint International Tropical Medicine Meeting, December 1-2, 2011, Bangkok, Thailand.
- 5) Jeelani, G., Sato, S., Husain, A., Escueta-de Cadiza, A., Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolic profiling of the protozoan parasite *Entamoeba* revealed activation of unpredicted pathway during encystation. PLoS ONE 7, e37740, 2012.
- 6) Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T.,

and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1831, 2012.

7) Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Soga, T., Suematsu, M., Nozaki, T. Biochemical and functional characterization of novel NADH kinase in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Biochimie. 2013 95, 309-319.

8) 佐藤暖, Afzal Husain, Ghulam Jeelani, 曾我朋義, 野崎智義 赤痢アメーバが L-システイン欠乏下で特異的に賛成するアミノ酸とリン脂質の同定、及びその生合成経路の解明 第 81 回日本寄生虫学会大会 March 23-24, 2012, Nishinomiya, Hyogo.

9) 間瀬望, 津久井久美子, 野崎智義 *Entamoeba invadens* における安定発現株の樹立 第 81 回日本寄生虫学会大会 March 23-24, 2012, Nishinomiya, Hyogo.

10) Jeelani, G., Dan, S., Husain, A., Escueta-de Cadiz, Sugimoto, M., Soga, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. Metabolome of encystation in *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan parasites. Glasgow, U.K., Sep 10-14, 2012.

11) Chiba, Y., Dan, S., Makiuchi, T., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Organelle metabolomics of *Entamoeba histolytica*. Metabolomics of Protozoan Parasites. Glasgow, U.K., Sep 10-14, 2012.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野崎智義 (NOZAKI, Tomoyoshi)  
研究者番号: 60198588

### (2) 研究分担者

津久井久美子 (TSUKUI, Kumiko)  
研究者番号: 00420092

佐藤暖 (SATO, Dan)  
研究者番号: 50468477

### (3) 連携研究者

Ghulam Jeelani  
研究者番号: 80725820