

令和元年6月21日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08768

研究課題名(和文) 赤痢アメーバに特異的な脂質を介した選択的輸送システムの解明

研究課題名(英文) Specific traffic system mediated by lipid in Entamoeba histolytica

研究代表者

中野 由美子(斉藤由美子)(Saito-NAKANO, Yumiko)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

研究者番号：30321764

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)：嫌気性寄生原虫の赤痢アメーバでは、EhRab8A GTPaseは小胞体に局在し、その機能欠損によって細胞表面へ特定のタンパク質の輸送に障害を示すことが報告されている。EhRab8A特異的に細胞表面に輸送されるタンパク質を同定するために、EhRab8A結合タンパク質としてCdc50のホモログを同定した。Cdc50ホモログの大量発現株は、Cdc50は小胞体に蓄積し、フォスフォコリンアナログのミルテフォシン耐性を示した。また、EhRab8A活性型発現株の表面のビオチン化により、新規の表面分子EHI_159620を同定した。以上の結果は、赤痢アメーバの多様な小胞体からの輸送機構の理解に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的な分泌タンパク質は、小胞体でCOPII小胞に包まれ、ゴルジ体を経て細胞表面に輸送される。COPII小胞に包まれるには、Sar1 GTPaseの機能が必要である。本研究では嫌気性寄生原虫の赤痢アメーバでは、RabファミリーのGTPaseが小胞体に局在し、小胞体から細胞表面への輸送を担う経路があることを発見した。この現象は、原虫におけるunconventional secretionの存在を示し、多様な輸送機構の理解に貢献する。

研究成果の概要(英文)：In enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica, EhRab8A GTPase is localized to the ER and needed for the correct transport of surface molecules, which might be needed for the cellular adhesion. In this work, I identified one of the binding protein of EhRab8A, homologue of Cdc50. In mammal, Cdc50 codes a non-catalytic subunit of lipid flippase P4-ATPase and localized to the plasma membrane. EhCdc50-overexpressing transformant amoeba showed that the accumulation of EhCdc50 to the amoebic ER and showed miltefosine resistance, that is broad anti-parasitic phosphocholine analogue. As a second EhRab8A dependent cargo protein, novel molecule EHI_159620 was identified by the biotinylation of constitutively-active EhRab8A expressing cells. Identification of these novel binding proteins of EhRab8A may reveal diverse traffic system in protozoa.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：赤痢アメーバ メンブラントラフィック 小胞体 Rab GTPase

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞表面タンパク質の輸送機構には特異的な輸送シグナルが存在し、一般的な分泌タンパク質は、小胞体で COPII 小胞に包まれ、ゴルジ体を経て細胞表面に輸送される。申請者は寄生性原虫の赤痢アメーバで、Rab GTPase をはじめとする膜輸送遺伝子群が多様化していることを発見しており、その中でも、赤痢アメーバの Rab8 ホモログ (EhRab8A) は小胞体に局在すること、EhRab8A の機能欠損株は貪食能が低下しており、特定の細胞表面タンパク質の提示が減少していたことを見いだした。

2. 研究の目的

原虫の細胞表面に提示されたレセプターは、宿主への侵入・感染や免疫からの回避に重要である。胞表面へのタンパク質輸送には、特定の輸送シグナルや脂質を介した輸送機構の存在が報告されているが、細胞内の輸送経路に着目した研究は少ない。申請者は、赤痢アメーバの表面タンパク質の輸送には、膜融合の分子スイッチである EhRab8 GTPase に依存した経路があることを発見した。本研究では EhRab8 依存的に輸送される選択的輸送機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) EhRab8A 結合タンパク質の同定

EhRab8 依存的な選択的輸送機構の解明を目指すために、EhRab8 結合タンパク質の同定を行った。myc-Rab8 を発現する形質転換アメーバをクロスリンカーで架橋後に Tx100 で可溶化し、抗 myc 抗体での共免疫沈降を行ったところ、約 35kDa のバンドが得られた。質量解析により共免疫沈降されたタンパク質を同定した。

(2) EhRab8A 特異的に輸送される表面分子の同定

EhRab8A GTPase 依存的に輸送される表面タンパク質の同定を試みた。まず、GTP 固定型の EhRab8A-Q66L 変異を発現する株の表面のビオチン化を行った。EhRab8A-Q66L 発現株は、赤血球への接着能が減少することが以前報告しているため、接着に必要な細胞表面タンパク質が提示できなくなっていることが予想された。ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズで精製し、銀染色を行ったところ、陰性対照の野生株と比較して、みかけの分子量 30kDa のタンパク質が EhRab8A-Q66L で減少していることが分かった。質量解析によって 30kDa のタンパク質の同定を質量解析により同定した。

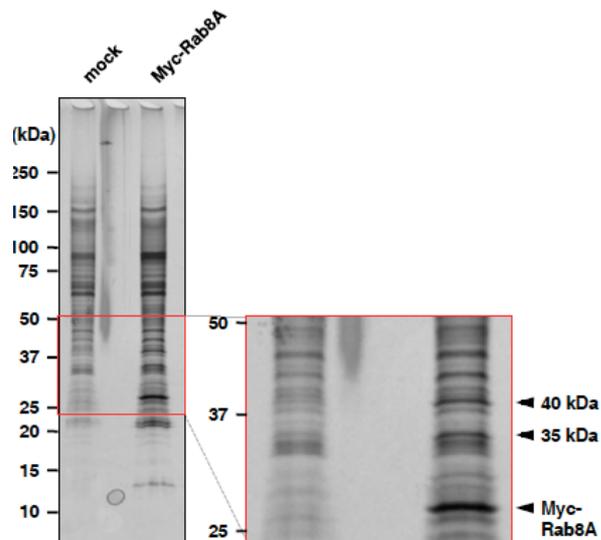
4. 研究成果

(1) EhRab8A 結合タンパク質 Cdc50 の同定

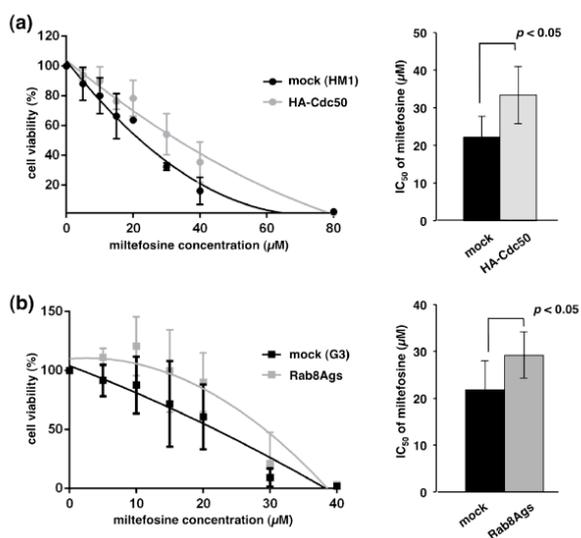
EhRab8A 特異的に検出される 35kDa のバンドを質量解析により解析した結果、human Cdc50 のホモログ (33% identity, e-value 1.3×10^{-33}) を得た。Cdc50 はリン脂質フリッパーゼとして機能する P4-ATPase の非触媒サブユニットである。

(図右)

哺乳細胞や酵母では、Cdc50 は定常状態では細胞膜やエンドソームに局在するが、大量発現によって Cdc50 は小胞体に蓄積することが報告されている。赤痢アメーバでも EhCdc50 (EHI_142740) の N 末端に HA タグを付加し、赤痢アメーバ内で大量発現する形質転換株を作製し、間接蛍光抗体染色を行ったところ、小胞体マーカーの Bip と HA-EhCdc50 のシグナルが一致した。また HA-EhCdc50 発現株では、HA-EhCdc50 が EhRab8A と小胞体で共局在していることも観察された。さらに、EhRab8A と HA-EhCdc50 が複合体を形成している事を、HA 抗体を使用した共免疫沈降によっても確認した。

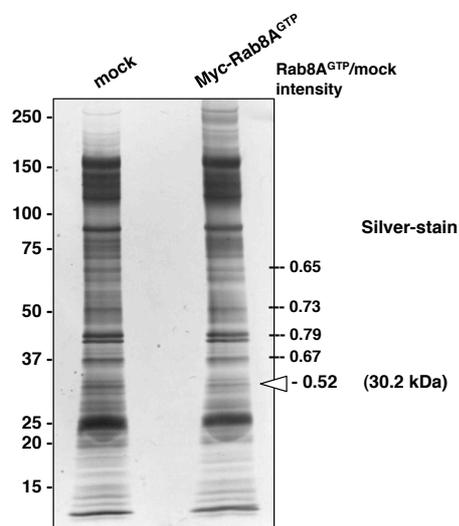


他種生物での報告より、HA-EhCdc50 発現株では、相互作用する P4-ATPase も細胞膜表面への輸送が阻害されていることが予測されたため、HA-EhCdc50 発現株のミルテフォシン感受性テストを行った (図右)。ミルテフォシンはフォスホコリンのアナログであり、赤痢アメーバやリーシュマニア原虫など、広い原虫種に殺滅作用を示すことが報告されている。その結果、HA-EhCdc50 発現株はミルテフォシンに耐性を示す事が分かった。さらに接着阻害を示す EhRab8A 発現抑制株でも、ミルテフォシンに耐性を示した事から、EhRab8A が小胞体から EhCdc50 ならびに細胞膜の P4-ATPase の輸送を担っている事が示された。最後に、HA-EhCdc50 発現株は、EhRab8A 発現抑制株が示す貪食の際の接着阻害を示さなかったため、EhRab8A が細胞表面に輸送する接着に関与する分子は他に存在する事が推測された。



(2) EhRab8A 特異的に輸送される表面分子 EHI_159620 の同定

EhRab8A 特異的に輸送される表面分子を同定するために、活性化型 EhRab8A 発現株の細胞表面のビオチン化を行い、特異的に検出される 30kDa のタンパク質を質量解析によって同定したところ、312 アミノ酸残基の EHI_159620 を候補として得た。EHI_159620 の分子量は 35.3kDa であり、シグナルペプチドや膜貫通領域が無く、一見、可溶性タンパク質であった。しかし、2 番目のアミノ酸にグリシンが存在し、N-ミリスチル化修飾の可能性が考えられた。以前、ドイツの Iris Bruchhaus のグループが赤痢アメーバの細胞表面タンパク質の網羅的同定を報告しており、その中で EHI_159620 は細胞表面に輸送されるタンパク質としての報告があった。EHI_159620 の発現抑制株を作製したところ、赤血球の接着が低下した。よって、Rab8A 依存的に輸送される表面接着に関与する新規のタンパク質が同定できた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Hanadate Y*, Saito-Nakano Y*, Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Identification and characterization of the *Entamoeba histolytica* Rab8a binding protein: a Cdc50 homolog. International Journal of Molecular Sciences, special issue Small GTPases. (2018) Nov 30;19(12). pii: E3831. doi: 10.3390/ijms19123831. *contributed equally to the study.

[学会発表] (計 2 件)

Yuki Hanadate, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki, Yumiko Saito-Nakano. The ER-resident Rab8A GTPase is involved in the trafficking of surface proteins necessary for phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. US-Japan meeting 2018. Feb 16. Nagasaki.

花館 有希, 津久井 久美子, 野崎 智義, 中野 由美子. 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおける EhRab8A GTPase 結合タンパク質 EhCdc50 の同定. 第 88 回日本寄生虫学会大会. 2019 年 3 月 15-16 日. 長崎.

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：<https://www.niid.go.jp/niid/ja/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中曾根 英子

ローマ字氏名：Eiko Nakasone

研究協力者氏名：花館 有希

ローマ字氏名：Yuki Hanadate

研究協力者氏名：川野 哲郎

ローマ字氏名：Tetsuro Kawano

※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、研究者個人に帰属されます。