

機関番号：32644

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590431

研究課題名 (和文) 赤痢アメーバと近縁アメーバ種における表面レクチン (IGL) の多型解析

研究課題名 (英文) Polymorphic analysis of surface lectins (IGL) of *Entamoeba histolytica* and related *Entamoeba* spp.

研究代表者

橘 裕司 (TACHIBANA HIROSHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10147168

研究成果の概要 (和文)：赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の虫体表面には、宿主細胞への接着に関与するレクチンサブユニット (intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin; Igl) が存在する。2つのアイソタイプ (Igl1 と Igl2) の遺伝子多型を 22 株について解析したところ、Igl1 は 5 タイプに分類され、Igl2 は 2 タイプに分類された。Igl1 と Igl2 の組み合わせは 7 通り存在したことから、2つの遺伝子座位間で組換えが生じたことが示唆された。非病原性の *Entamoeba dispar* やマカク由来の *E. nuttalli* の分離株においても、2つの Igl 遺伝子の多型が認められた。

研究成果の概要 (英文)：Intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin (Igl) located on the surface of *Entamoeba histolytica* trophozoites is involved in amebic adherence to host cells. When genetic diversity of two Igl genes was analyzed in 22 isolates of *E. histolytica*, Igl1 and Igl2 genes were divided into 5 and 2 types, respectively. Since seven types of combination between Igl1 and Igl2 were observed, occurrence of recombination between the two loci was suggested. Polymorphism of two Igl genes was also observed in *E. dispar* and *E. nuttalli* isolates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究代表者の専門分野：寄生原虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：赤痢アメーバ、*Entamoeba dispar*、*Entamoeba nuttalli*、表面蛋白質、遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は熱帯・亜熱帯を中心に世界中に分布しており、年間約 5 千万人が大腸炎や肝膿瘍を発症し、約 10 万人が死亡している。我が国でも赤痢

アメーバ症は年々増加している。赤痢アメーバには、形態的に区別できないが病原性のない *Entamoeba dispar* など近縁の *Entamoeba* 種も存在するため、正確に同定することが早期に治療を開始するためにも

重要である。また、種同定だけでなく、感染経路や地理的由来の解明につながるような赤痢アメーバ株の多型解析法を確立することが、現在望まれている。さらに、ワクチン開発につながるような、標的として有効な表面抗原の同定も重要である。我々は、赤痢アメーバの栄養型表面に接着に関与するシステインリッチな蛋白質 *Igl* (intermediate subunit of Gal/GalNAc lectin) が存在することを見いだした。*Igl* 遺伝子は2つ存在し、HM-1:IMSS 株では1101 アミノ酸の *Igl1* と1105 アミノ酸の *Igl2* をコードしている。予備的な検討において、数株の *Igl* 遺伝子の塩基配列を比較したところ、地理的分布の違いを反映する多型が認められた。従来、赤痢アメーバのいくつかの遺伝子において多型解析が試みられており、中でもセリンリッチ蛋白質遺伝子は最も良く解析されている。しかし、非常に多くの多型が存在し、finger printing 的解析には適しているが、多型を集約することが困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では、様々な地域に由来する赤痢アメーバの多数の株について *Igl* 遺伝子を解析し、多型の詳細を把握する。*Igl* の存在を確認している *E. dispar* についても複数の株を解析し、2つの *Igl* 遺伝子が生じた後に赤痢アメーバと *E. dispar* が分岐したのか、分岐した後にそれぞれにおいて遺伝子重複が起きたのかを明らかにする。また、我々は最近、ネパールのアカゲザルから新種のアメーバを分離している。このアメーバは当初は赤痢アメーバと考えられたが、rRNA 遺伝子の解析から赤痢アメーバと *E. dispar* の中間に位置し、その他の遺伝子の解析でも赤痢アメーバと異なり、またザイモデーム分析においても新しいパターンを示すことが明らかになった。そこで、我々はこのアメーバに対して *E. nuttalli* という学名を提唱している。本研究では新たに *E. nuttalli* の株分離を行うとともに、*E. nuttalli* にも *Igl* が存在するかどうかを解析する。

## 3. 研究の方法

赤痢アメーバの様々な株の栄養型虫体を TYI-S-33 培地で無菌培養した。*E. dispar* は、YIMDHAS 培地で無菌培養または *Crithidia fasciculata* と共棲培養した。日本各地のニホンザル、ネパールとインドのアカゲザル、スリランカのトクザルについて、*E. nuttalli* 感染の検索を行った。シスト陽性糞便から田辺千葉培地を用いて栄養型虫体を分離し、YIMDHAS 培地で *C. fasciculata* と共棲培養した後、YIMDHAS 培地あるいは TYI-S-33 培地で無菌培養した。

培養栄養型虫体よりゲノム DNA を単離し、

*Igl* 遺伝子を PCR 増幅した。*Igl* 遺伝子の全長を増幅した場合には、クローニング後、塩基配列を決定した。また、*Igl1*、*Igl2* 遺伝子それぞれに特異的なプライマーを用いて、全長にできるだけ近い範囲を PCR 増幅し、増幅産物から直接塩基配列を決定した。遺伝子解析には、Genetyx-Mac、PAUP beta ver 4.0、MEGA ver 3.1、DnaSP ver 4.0 を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 赤痢アメーバの *Igl* 遺伝子の解析

赤痢アメーバの国内分離株を中心に ATCC 登録株を含め、22 株について *Igl* 遺伝子の塩基配列を決定し、多型の解析を行った。その結果、*Igl1* には9個のハプロタイプが存在し、大きく5つのタイプ (A~E) に分類できた (図1)。内訳は、Aタイプ8株、Bタイプ5株、Cタイプ1株、Dタイプ3株、Eタイプ5株であった。Aタイプ8株の配列は完全に一致しており、BタイプとDタイプは2つのサブタイプに、Eタイプは3つのサブタイプに分かれた。また、22株のなかで国内分離株12株は、Aタイプが7株、Bタイプは1株、それにCタイプ、Dタイプのすべてで、Eタイプは含まれなかった。一方、*Igl2* には10個のハプロタイプが存在した。大きく2つのタイプ (A, B) に分かれ、Aタイプ13株、Bタイプ9株であった。Aタイプは4つのサブタイプに、Bタイプは6つのサブタイプに区分された。国内分離株では、Aタイプが9株、Bタイプは3株であった。

また、各株における *Igl1* と *Igl2* の組み合わせをみると、大きく7通りに分類できた (表1)。もし、2つの遺伝子座位間でランダムに組換えが生じれば組み合わせは10通りで、組換えがないと5通りになる。従って、2つの組み合わせのタイプは組換えによる産物であることが示唆された。

表1. 赤痢アメーバ22株における *Igl1* 遺伝子と *Igl2* 遺伝子の組み合わせ

<i>Igl1</i>	<i>Igl2</i>	株数
A	A	6
A	B	2
B	A	5
B	B	0
C	A	0
C	B	1
D	A	2
D	B	1
E	A	0
E	B	5

また、それぞれの遺伝子内における組換えサイトを検索したところ、*Igl1* では 41 カ所検出され、遺伝子のほぼ全長にわたってみられた。一方、*Igl2* では 5 カ所検出され、遺伝子中央部および 3' 側に見られた。

### (2) *E. dispar* の *Igl* 遺伝子の解析

*E. dispar* については、地理的由来の異なる 3 株について *Igl* 遺伝子を解析した。その結果、赤痢アメーバ同様にそれぞれの株で 2 つの *Igl* 遺伝子が存在し、*Igl1* と *Igl2* を明確に区別することができた。*E. dispar* の *Igl1* では、赤痢アメーバの *Igl1* に比べて多型が限定されていた。一方、*E. dispar* の *Igl2* では *Igl1* よりも多型性が大きいものの、赤痢アメーバの *Igl2*、*Igl1* に比べると小さいものであった。多型の度合いとその領域は、*Igl1* と *Igl2* の間、及び種の間で異なっており、それぞれの遺伝子が異なった進化的歴史を経ていることが示唆された。赤痢アメーバと *E. dispar* における系統樹解析から、2 つの *Igl* 遺伝子は共通祖先において遺伝子重複していたのではなく、それぞれのアメーバ種において独立に遺伝子重複がおきたと推定された (図 1)。

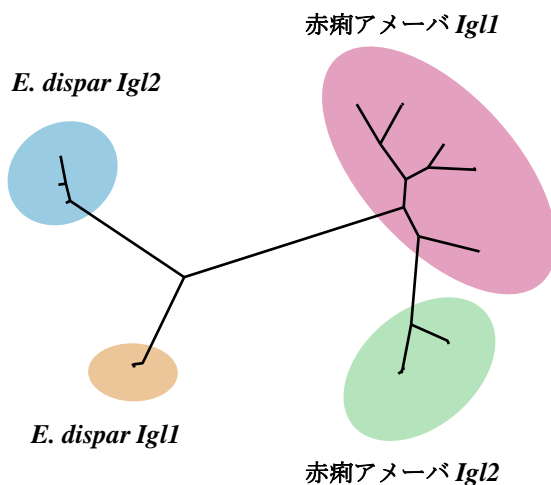


図 1. 赤痢アメーバと *E. dispar* における *Igl1* 遺伝子と *Igl2* 遺伝子の系統樹解析

### (3) *E. nuttalli* の分離と *Igl* 遺伝子の解析

わが国各地に分布するニホンザル、ネパールとインドのアカゲザル、スリランカのトクザルなど、*Macaca* 属の異なる種、あるいは同種でも異なる地域に分布するマカクについて腸管寄生アメーバの感染状況を調べ、*E. nuttalli* の分布を明らかにした。そして、新たな *E. nuttalli* 株の分離培養を行った。いくつかの分離株については無菌化に成功し、栄養

型虫体のクローニングを行った。最初にネパールで分離した P19-061405 株のゲノム DNA の解析結果に基づいてプライマーの設計を行い、様々な *E. nuttalli* 分離株について、*Igl1* 遺伝子と *Igl2* 遺伝子の直接塩基配列決定を行った。その結果、*E. nuttalli* の *Igl1* は 1099~1102 のアミノ酸残基からなり、赤痢アメーバ HM-1:IMSS 株の *Igl1* との同一性は 82%~86%、*E. dispar* SAW760 株の *Igl1* との同一性は 75%~77% であった。そして、*E. nuttalli* 分離株に見られる *Igl* 多型は、宿主の種や分布地域の違いを反映していることが明らかになった。

### (4) 今後の展望など

本研究において赤痢アメーバとその近縁アメーバにおける *Igl* 遺伝子の多型が明らかになった。特に、赤痢アメーバにおいて組換えが生じていることを示唆できたのは本研究の大きな成果である。組換えが実際に起こっているかどうかについては、更に実験的な証明が必要である。*Igl* の多型情報は、今後、この分子を標的とした診断法や防御免疫の構築に生かすことができる。また、本研究において、多様な *E. nuttalli* 株を様々な *Macaca* 属のサルから分離できた。そして、*E. nuttalli* は *E. dispar* よりも赤痢アメーバに近縁な種であることが確認された。今後、様々な *E. nuttalli* 株の全ゲノム塩基配列を解析し、赤痢アメーバの塩基配列と比較することで、アメーバと宿主の共進化などについての新たな知見が得られると期待できる。

### 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 8 件)

- ① Feng M., Yang B., Yang L., Fu Y., Zhuang Y., Liang L., Xu Q., Cheng X. and Tachibana H. High prevalence of *Entamoeba* infections in captive long-tailed macaques in China. *Parasitol. Res.*, 査読有, 108:in press, 2011
- ② Fu Y.-F., Nagakura K., Cheng X.-J. and Tachibana H. Comparison of serine-rich protein genes of *Entamoeba histolytica* isolates obtained from institutions for the mentally retarded in Kanagawa and Shizuoka Prefectures, Japan. *Parasitol. Res.*, 査読有, 107:999-1002, 2010
- ③ Tachibana H., Yanagi T., Akatsuka A., Kobayashi S., Kanbara H. and Tsutsumi V. Isolation and characterization of a potentially virulent species *Entamoeba nuttalli* from captive Japanese

macaques. Parasitology, 査読有, 136:1169-1177, 2009

- ④ Takano J., Tachibana H., Kato M., Narita T., Yanagi T., Yasutomi Y. and Fujimoto K. DNA characterization of simian *Entamoeba histolytica*-like strains to differentiate them from *Entamoeba histolytica*. Parasitol. Res., 査読有, 105:929-937, 2009
- ⑤ Tachibana H., Cheng X.-J., Tsukamoto H. and Itoh J. Characterization of *Entamoeba histolytica* intermediate subunit lectin-specific human monoclonal antibodies generated in transgenic mice expressing human immunoglobulin loci. Infect. Immun., 査読有, 77:549-556, 2009

[学会発表] (計9件)

- ① 橘 裕司, 柳 哲雄, 小林正規, 平山謙二, Ganguly S. インドのアカゲザルからの *Entamoeba nuttalli* の分離と性状解析. 第51回日本熱帯医学会大会. 2010年12月3日. 仙台
- ② 橘 裕司, 小林正規, 柳 哲雄, 松林清明. 病原アメーバ種 *Entamoeba nuttalli* のニホンザルからの分離と性状解析. 第79回日本寄生虫学会大会. 2010年5月20日. 旭川
- ③ 橘 裕司, 柳 哲雄, Lama C., 小林正規, Sherchand J. 平山謙二. ネパールのアカゲザルにおける *Entamoeba nuttalli* の感染状況. 第50回日本熱帯医学会大会. 2009年10月22日. 沖縄
- ④ 橘 裕司, 程 訓佳, 塚本秀雄, 伊東丈夫. 赤痢アメーバの表面レクチン IGL に特異的なヒトモノクローナル抗体の性状解析. 第78回日本寄生虫学会大会. 2009年3月27日. 東京
- ⑤ Tachibana H., Cheng X.-J., Tsukamoto H. and Itoh J. Production and characterization of fully human monoclonal antibodies to *Entamoeba histolytica* intermediate subunit lectin. 43rd Annual U.S.-Japan Joint Conference on Parasitic Diseases. 2009年1月8日. 東京
- ⑥ 橘 裕司, 柳 哲雄, 小林正規, 神原廣二. 長崎市の飼育ニホンザルから分離された *Entamoeba nuttalli* の性状解析. 第49回日本熱帯医学会大会・第23回日本国際保健医療学会学術大会合同大会. 2008年10月25日. 東京
- ⑦ Cheng X., Chen Y. Yang B., Feng M., Xu L. and Tachibana H. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* infection in China 13th International Congress on

Infectious Diseases. 2008年6月21日. クアラ Lumpur

- ⑧ 橘 裕司, 小林正規, 柳 哲雄, 竹内 勤, 田邊和裕. 赤痢アメーバにおける2つの Igl 遺伝子の多型解析. 第77回日本寄生虫学会大会. 2008年4月4日. 長崎ブリックホール

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橘 裕司 (TACHIBANA HIROSHI)  
東海大学医学部・准教授  
研究者番号: 10147168

### (2) 連携研究者

小林正規 (KOBAYASHI SEIKI)  
慶応義塾大学医学部・講師  
研究者番号: 70112688

### (3) 研究協力者

田邊和裕 (TANABE KAZUYUKI)  
大阪大学微生物病研究所・教授  
研究者番号: 40047410

柳 哲雄 (YANAGI TETSUO)  
長崎大学熱帯医学研究所・助手  
研究者番号: 10174541