

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590513

研究課題名(和文)腸管寄生性原虫赤痢アメーバのリソソーム酵素輸送の分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of unique lysosomal soluble protein transporting receptor family proteins in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*

研究代表者

津久井 久美子 (Tsukui, Kumiko)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

研究者番号：00420092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢アメーバの分泌する加水分解酵素は大腸への病変形性に重要である。この酵素は細胞内ではリソソームに存在することから細胞内輸送経路の解析を行い、ユニークな酵素輸送受容体cysteine protease binding protein family (CPBF)を発見した。11存在するCPBFのうち、CPBF1はタンパク質分解酵素を、5分子は糖分解酵素を輸送していた。CPBFは6個のbacterial pre-peptidase C-terminal (PPC)ドメインから構成されており、このドメインがリガンド認識に重要であることが示された。赤痢アメーバにユニークな分子機構の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：Lysosomal soluble proteins are targeted to endosomes and lysosomes by specific receptors. The enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* has a novel class of lysosomal targeting receptors, named the cysteine protease binding protein family (CPBF). Among 11 CPBFs, CPBF1 is a solo receptor for cysteine proteases and other 6 CPBFs recognize glycolytic enzymes, i.e. amylases, -hexosaminidases, and lysozymes. It was shown by bioinformatics analysis and phylogenetic reconstruction that each CPBF contains six prepeptidase carboxyl-terminal domains, and the domain configuration is evolutionarily conserved among CPBFs. Taken together, CPBFs with unique and conserved domain organisation have a remarkable ligand heterogeneity toward cysteine protease and carbohydrate degradation enzymes. These findings add new insights into the unique molecular event in enteric protozoan pathogen *E. histolytica*.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：lysosome receptor traffic *Entamoeba histolytica*

## 1. 研究開始当初の背景

システインプロテアーゼ(CP)は寄生体から分泌され宿主細胞の障害を行い、寄生体内では貪食等により取り込んだ細菌・細胞や栄養素の消化を行う。よって CP の細胞内輸送経路・分泌経路の解明は赤痢アメーバの生存と病原機構において重要な研究課題である。リソソーム酵素はトランスゴルジネットワークからリソソームへ受容体を介して輸送される。赤痢アメーバには既知のリソソーム酵素輸送受容体は保存していないが、ユニークなレセプターを持つことを我々が見出した(Nakada-Tsukui et al., Cell. Microbiol, 2012)。cysteine protease binding protein family: CPBF1 は赤痢アメーバで優位に発現している CP の一つである CP-A5 に結合する分子として同定された。また 11 のファミリー分子である CPBF のうち CPBF8 も CPBF1 同様貪食胞のプロテオーム解析(Okada et al., 20005)で見出されており、その遺伝子発現抑制がリガンドである  $\alpha$ -hexosaminidase, lysozymes の貪食胞への輸送を阻害したこと(Furukawa et al., PLoS Pathog., 2012)から、CPBF はそれぞれのリガンドをリソソームやファゴソームへ輸送する受容体であることが明らかとなった。これは生物界で初めて明らかとなったファミリー分子によるリソソーム酵素輸送体であった。

## 2. 研究の目的

本研究では赤痢アメーバで初めて見つかった CPBF によるリソソーム酵素輸送システムの詳細な分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的にはほかの CPBF ファミリー分子のカーゴの同定と CPBF 自体の輸送を制御する分子機構の解明。また、カーゴが同定されている CPBF と各カーゴがどのような立体構造を介して結合するのかを理解するために結晶構造解析を目指した。また、一次配列の検索では CPBF のドメイン構成が不明であるため、立体構造を含めた解析をバイオインフォマティクスを専門とする研究者と協力して行い、CPBF の分子構造の解明を行った。

## 3. 研究の方法

### (1)CPBF6 の機能解析

以前我々の研究室で行われた赤痢アメーバファゴソームのプロテオーム解析から、CPBF1, CPBF8 とともに検出されていた CPBF6 についてその機能解析を行った。

#### a. CPBF6 リガンドの特定

CPBF6 の C-末端側に HA タグを挿入し、CPBF6-HA 融合タンパク質として発現するベクターを構築し、赤痢アメーバ株 HM1:IMSS c16 に導入し CPBF6-HA 発現株を得た。CPBF6-HA 株とベクターコントロール株である HA 株から抗 HA 抗体結合ビーズを用いて免疫沈降を行い HA ペプチドで溶出した。このサ

ンプルを 5~20%のグラディエントゲルで SDS-PAGE 後、銀染色を行い CPBF6-HA サンプルで特異的に共免疫沈降されるタンパク質を検索した。特異的バンドを切り出し、質量分析にて当該タンパク質を同定した。

#### b. CPBF6 遺伝子発現抑制株の作成と表現型の検討

CPBF6 の機能を知るため、特異的遺伝子発現抑制(gene silencing: gs)株を作成した。CPBF6gs 株と親株からのファゴソームプロテオーム解析を行い CPBF6 の欠損でファゴソームへの輸送が阻害されるタンパク質の検索を行った。

#### c. CPBF6 の局在に關与する領域の決定

CPBF6 の細胞質ドメイン全体または半分を欠損させたミュータントを作成し、CPBF6 の貪食胞への局在を検討した。

### (2)CPBF のリガンド探索

11 ある CPBF のうちリガンド探索を行っていなかった CPBF2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 について、HA タグとの融合タンパク質として発現させ、抗 HA 抗体を用いた免疫沈降と質量分析によりリガンドの同定を行った。

### (3)CPBF の構造の解析(バイオインフォマティクス)

産業技術総合研究所・創薬基盤技術研究部門・ゲノム情報研究センターの富井健太郎生体分子情報研究チーム長との共同研究により、CPBF の構造予測、ドメイン構造の解明を行った。

### (4)CPBF の PPC ドメインによるリガンド結合能の評価

上記の構造解析から見出された CPBF を構成する bacterial pre-peptidase C-terminal (PPC)ドメインが、単体でリガンドとの結合能を持つのか評価した。CPBF 1 の 6 つの PPC ドメインについて GST との融合タンパク質を大腸菌で発現、GST カラムで精製後赤痢アメーバ粗抽出液と反応させ、リガンドである CP-A5 との結合をウエスタンブロットで評価した。

### (5)CPBF の結晶構造解析

愛媛大学プロテオサイエンスセンターの坪井敬文教授、高島英造准教授、京都工業繊維大学の原田繁春教授、志波智生准教授との共同研究により CPBF1 の結晶化とその解析を試みた。

## 4. 研究成果

### (1)CPBF6 の機能解析

#### a. CPBF6 リガンドの特定

CPBF6-HA 株とコントロール株からの抗 HA 抗体による免疫沈降により 75, 50 k Da の CPBF6-HA 株特異的なバンドが検出された。こ

のバンドを切り出し、質量分析を行い、75kDaのバンドから  $\alpha$ -amylase(EHI\_044370, XP\_652380) を、50kDa のバンドから  $\gamma$ -amylase (EHI\_023360, XP\_655636)を同定した。予想分子量は各 77.6、56.7kDa であり、切り出された大きさとほぼ一致した。

#### b. CPBF6 遺伝子発現抑制株の作成と表現型の検討

CPBF6 の遺伝子発現抑制株を作成し、その貪食胞へのCPBF6のリガンドである  $\alpha$ -amylase、 $\gamma$ -amylase の輸送を評価した。CPBF6gs 株ではコントロール株で観察される貪食胞への  $\alpha$ -amylase、 $\gamma$ -amylase の集積がなくなり、CPBF6 も CPBF1, 8 同様にリガンドを貪食胞やリソソームへ輸送する輸送受容体として機能することが考えられた(図1・A)。さらに貪食胞のプロテオーム解析からこれらの amylase の集積が減少していることが見出された(図1・B)。しかし2つの amylase 以外に有意に集積が減少したタンパク質は見出せなかった。また、細胞全体と貪食胞のアミラーゼ活性を測定したが有意な差はみられなかった。これは  $\alpha$ -amylase などの他の酵素による相補的な活性が存在するためと考えられた。

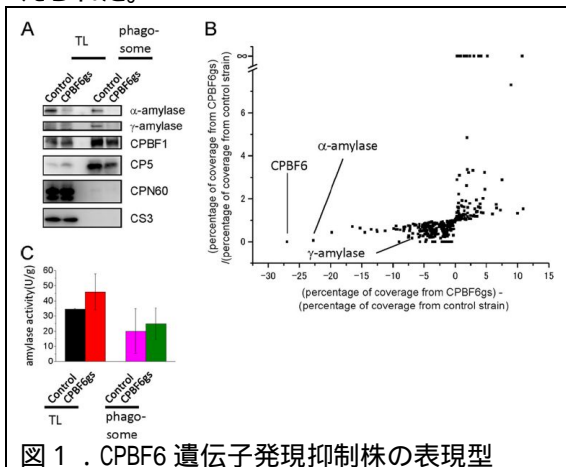


図1. CPBF6 遺伝子発現抑制株の表現型

#### c. CPBF6 の局在に關与する領域の決定

CPBF6 の15アミノ酸からなる細胞質ドメインを全てまたはC-末端側8アミノ酸欠損させた変異体を発現させ、貪食胞への局在を検討した。すると細胞質側15アミノ酸を全て欠損した変異体は貪食胞への局在が消失し、8アミノ酸欠損させた変異体は局在変化がみられなかった。C-末端側には他種生物でアダプタータンパク質複合体と結合するモチーフとして知られる Yxx モチーフが存在するが、その重要性はCPBF6の局在に関しては高くないと考えられた。一方で細胞質ドメインが局在の決定に重要であることが示された。

#### (2)CPBF のリガンド探索

CPBF2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11-HA 発現株を樹立し、抗 HA 抗体による免疫沈降と質量分析により結合タンパク質の同定を行った。この結果、表に示すリガンドが同定された。

(CPBF1, 8 については先行研究の結果。)新たに CPBF2, 7, 10 のリガンドを決定した。しかし他の CPBF については有意に結合するタンパク質が見出せず、結合条件の検討、融合するタグの変更などの工夫が必要である。リガンドが同定された CPBF について、CPBF1 のみが CP への結合能を持つことが明らかとなった。また、これまで同定された CP 以外のリガンドはほとんどが糖分解酵素であった。CP と糖分解酵素をどのように見分けているのか? リソソームに輸送される加水分解酵素として脂質や核酸分解酵素も予想されたがそれらはどのように輸送されるのか? 今後の研究が必要である。

CPBF	protein name	AmoebaDB accession #
1	EhCP-A5	EHI_168240
	EhCP-A2	EHI_033710
	EhCP-A4	EHI_050570
	EhCP-A1	UniProtKB/Swiss-Prot: Q01957.1
	EhCP-A6	EHI_151440
	$\alpha$ -amylase	EHI_152880
2	$\alpha$ -amylase family protein	EHI_023360
	$\gamma$ -amylase	EHI_044370
6	$\beta$ -N-acetylhexosaminidase	EHI_012010
	$\beta$ -N-acetylhexosaminidase, beta subunit	EHI_007330
7	pore-forming peptide amoebapore B precursor	EHI_194540
	$\beta$ -hexosaminidase alpha-subunit	N/A
8	lysozyme1	EHI_199110
	lysozyme2	EHI_096570
10	$\alpha$ -amylase	EHI_153100/EHI_119580
	$\alpha$ -amylase family protein	EHI_023360
	$\beta$ -amylase	EHI_192590

Legend:   
■ cysteine proteases ■ amylases   
■  $\beta$ -hexosaminidase ■ lysozymes

表. CPBF のリガンド一覧

#### (3)CPBF の構造の解析 (バイオインフォマティクス)

富井らが開発したタンパク質立体構造予測を加えた解析 (FORTE ; <http://cbrc3.cbrc.jp/forte/index.html>) により CPBF は6個の PPC ドメインから構成され、二次構造として  $\beta$ -シート構造のみ存在することが明らかとなった。

11のCPBFに存在する6個のPPCドメイン(D1~D6)をについて系統解析を行った(図2) CPBF のドメインはドメインごとにクレードを作ることから6個のPPCドメインを持つCPBFの前駆タンパク質が確立され、その後11種に分化したと考えられた。

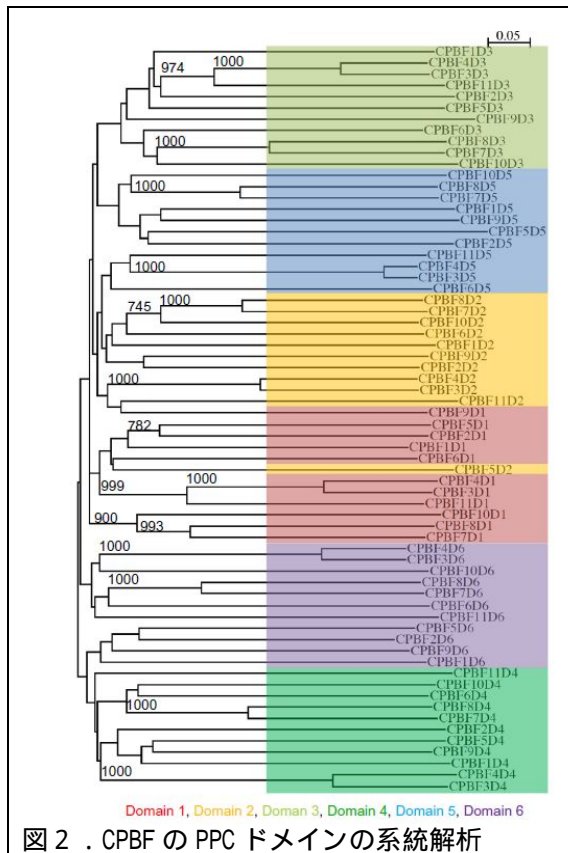


図2 . CPBF の PPC ドメインの系統解析

(4)CPBF の PPC ドメインによるリガンド結合能の評価

CPBF1 の 6 種の PPC ドメインを単独で GST 融合の組換えタンパク質として大腸菌で発現・精製し、赤痢アメーバ粗抽出液と反応後、リガンドである CP-A5 をウェスタンブロットにより検出した。ドメイン 4 (D4) は発現が安定せず今回の解析からは除いたがそれ以外の D1 ~ D6 は良好に発現・精製された (図 3・A)。D3, D5 が D1, D6 に比べ有意に CP-A5 との高い結合能を示した ( $P < 0.05$ , 図 3・B, C)。よって PPC ドメイン単独でリガンド特異性と結合能を持つことが明らかとなった。

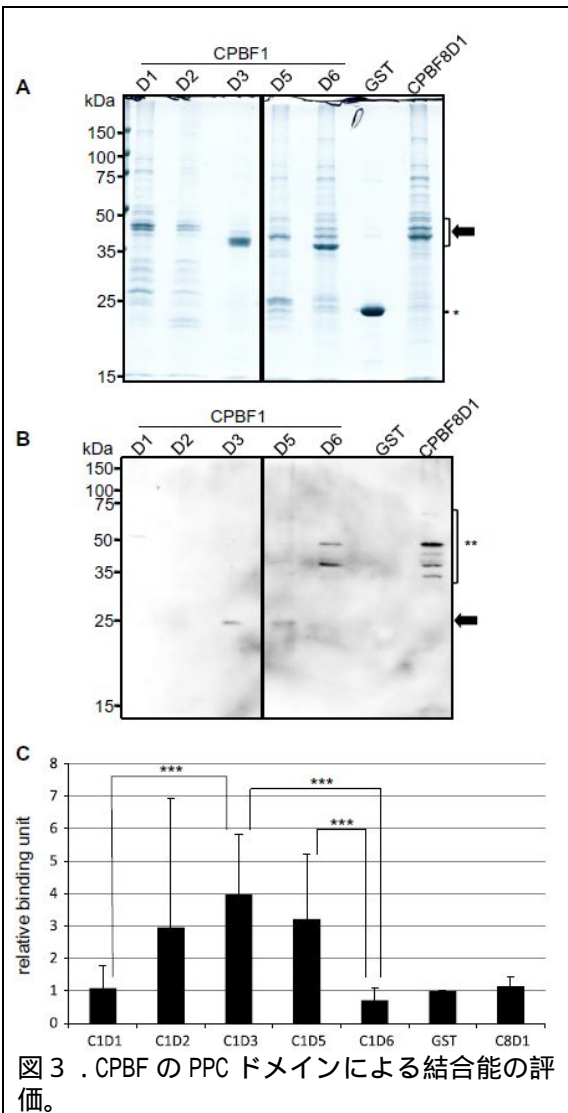


図3 . CPBF の PPC ドメインによる結合能の評価。

(5)CPBF の結晶構造解析

単一のドメイン構造を持つ 11 の CPBF の多様なリガンド特異性を説明する分子基盤を知るため、CPBF1 と CP-A5 の結合様式を明らかにすることを目標に、CPBF1 の結晶構造解析を目指した。まず、CPBF1 の 6 個の PPC ドメイン全てを含む、ルーミナルドメイン全体を愛媛大学プロテオサイエンスセンターとの共同研究で、コムギ胚芽無細胞系での組換えタンパク質として発現させ、ゲルろ過カラムにて精製後、京都工芸繊維大学にて結晶化の条件検討と解析を行った。CPBF1 のコドンコムギにあわせたところ十分な発現量が得られた (図 4)。結晶化の条件検討で 2 つの小型の結晶らしきものが観察されたため高エネルギー加速器研究機構の Photon Factoryにて回折像の取得を試みたが有用なデータは得られなかった。よって細胞内ドメイン全体の結晶化は難しいと判断した。

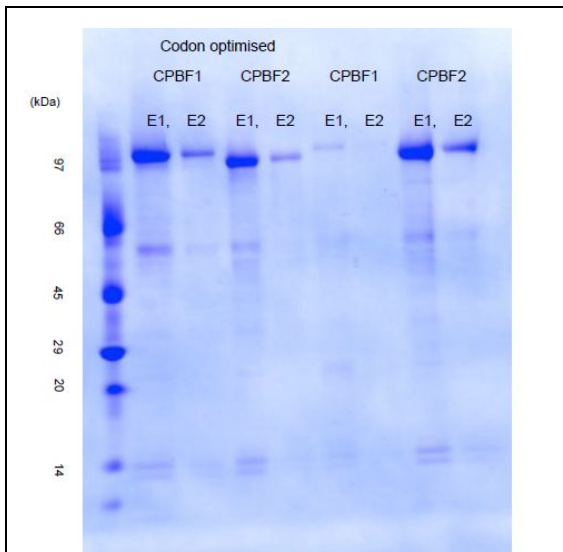


図4. コムギコドンとしたCPBF1, 2のコムギ胚芽無細胞系を用いた発現

次にCPBF1のPPCドメインを単体で結晶化することを試みた。前述の実験から最もリガンドとの結合能が高いと考えられたCPBF1のドメイン3のGSTとの融合タンパク質の結晶化を考えたが、回収量が少なく、この状態での結晶化は困難と考えられた。そこで低温誘導が可能なpColdIベクターを用い、His-tagとの融合タンパク質として発現させた(図5)。300mLの培養液から約1mgの組換えタンパク質が回収され、結晶化に十分なタンパク質量が達成できた。しかしNi-NTAカラム精製だけでは共雑タンパク質が除ききれないことから更なる精製を行い、結晶化を行う予定である。

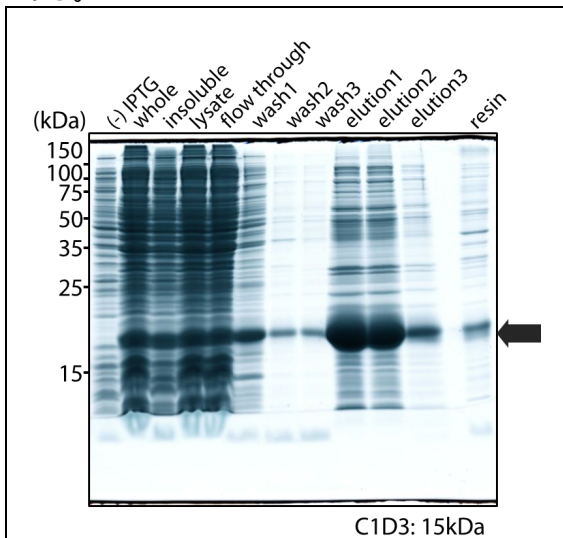


図5. His-CPBF1PPC3の発現

本研究から赤痢アメーバが持つユニークなリソソーム酵素輸送受容体CPBFの理解が進んだ。新たに加わったCPBF6の解析とCPBF2, 7, 10のリガンドの特定から、ファミリータンパク質の多くは輸送受容体であると考えられ、CP以外に多様な糖分解酵素を輸送すると考えられた。またバイオインフォマティクスからCPBFがPPCドメイン6個からなる

タンパク質であること、 $\alpha$ -シートのみで構成されることが明らかとなった。現在のデータベースでPPCドメイン6個で構成されるタンパク質のエントリはCPBF以外発見されていない。よって赤痢アメーバにユニークな分子機構として、創薬標的となる可能性がある。最近ヒト大腸組織を用いたex-vivo実験から赤痢アメーバと大腸組織の接触依存的に転写が上昇する遺伝子として $\alpha$ -amylaseが同定された。さらに $\alpha$ -amylaseが組織侵入に重要であることも示された(Thibeaux et al., Cell Microbiol., 2013)。この $\alpha$ -amylaseはCPBF10に結合する分子として見出されたものと一致しており、CPBFを介した輸送と病原機構への関与について解析する必要がある。CPBF6のC末端側の欠損変異体が貪食胞へ輸送されなかったことから、多くの輸送受容体のようにC-末端側の細胞質側ドメインが受容体の輸送に重要であることが示された。オルガネラ側にあるリガンド認識の分子機構は赤痢アメーバ独自の発展を遂げた一方で、輸送制御機構は真核生物に広く保存した分子機構で行われていることが予想される。赤痢アメーバにおける受容体輸送の分子機構は未だ解明されておらず、今後の解明が待たれる。CPBFの機能で最も注目されるのがリガンド認識の分子機構である。このためには結晶構造解析が必須である。今回挑戦したCPBF1の6個のPPCドメインを含むオルガネラ側全体での結晶化は困難であったが、今後単離したPPCドメインでの構造解析を進め、分子機構に迫りたい。

##### 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 2件)

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*. Infect. Immun. (2013) 81:1820-1829.

Marumo K, Nakada-Tsukui K, Tomii K, Nozaki T. Ligand heterogeneity of the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. Int. J. Parasitol. (2014) 44:625-635.

[学会発表](計 12件)

津久井久美子、丸茂このみ、富井健太郎、野崎智義、Ligand heterogeneity of the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるリソソーム酵素輸送受容体分子ファミリー(CPBF)のリガンド多様性とドメイン構造の解析 第37回日本分子生物学会年

会 2014年11月25日~27日 横浜市

丸茂このみ、野崎智義、津久井久美子、赤痢アメーバにおけるリソソーム酵素輸送受容体ファミリーの解析 第22回分子寄生虫学ワークショップ・第13回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 2014年8月31日~9月3日 帯広市

津久井久美子 赤痢アメーバ原虫におけるリソソーム酵素受容体の機能解析 新学術領域研究「マトリョーシカ型進化原理」班会議 2014年7月11日~13日 文京区

津久井久美子、丸茂このみ、中野由美子、野崎智義 寄生性原虫赤痢アメーバにユニークなリソソーム酵素輸送受容体群 第66回日本細胞生物学会大会 (シンポジウム「比べてみよう:細胞ダイナミクスの共通性と独自性」) 2014年6月11日~13日 奈良市

丸茂このみ、野崎智義、津久井久美子 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) におけるリソソーム酵素輸送受容体のドメイン解析 第83回日本寄生虫学会大会 2014年3月27日~28日 松山市

津久井久美子、丸茂このみ、佐藤映美、野崎智義 赤痢アメーバで見つかった新規システインプロテアーゼ輸送受容体の解析 第86回日本生化学会大会 (シンポジウム「病原体が広げる膜生化学、膜生化学が切り込む感染症」) 2013年9月11日~13日横浜市

丸茂このみ、野崎智義、津久井久美子 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるリソソーム酵素輸送受容体のドメイン解析 第2回日本細胞共生学会若手の会 2013年9月21日~22日 京都市

丸茂このみ、野崎智義、津久井久美子 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるリソソーム酵素輸送受容体のドメイン解析 第21回分子寄生虫学ワークショップ 2013年8月25日~28日 神戸市

渡辺菜月、野崎智義、津久井久美子 *Entamoeba histolytica* における脂質シグナルの解析 第21回分子寄生虫学ワークショップ 2013年8月25日~28日 神戸市

丸茂このみ、野崎智義、津久井久美子 赤痢アメーバリソソーム酵素受容体ファミリー (CPBF) の新規リガンドの同定 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月29日~31日 文京区

Kumiko Nakada-Tsukui, Kentaro Tomii, Konomi Marumo, Emi Sato, Eizo Takashima, Too Shiba, Paul Horton, Takafumi Tsuboi,

Shigaharu Harada, Tomoyoshi Nozaki Unique lysosomal targeting system in *Entamoeba histolytica*. XVII Seminario sobre Amibiasis 2013, March 1-5, 2013, Merida, Mexico.

津久井久美子、丸茂このみ、野崎智義 赤痢アメーバ原虫にユニークなリソソーム酵素輸送機構の解明 第72回日本寄生虫学会東日本支部会/第10回分子寄生虫マラリアフォーラム 2012年10月12日~13日前橋市

〔図書〕(計 1件)

Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Molecular basis of the trafficking of cysteine proteases and other soluble lysosomal proteins in *Entamoeba histolytica*. In "Amibiasis: Biology and Pathogenesis of *Entamoeba*" Edited by Tomoyoshi Nozaki and Alok Bhattacharya. Springer, 2014.

〔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

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-lab-e/473-para/1461-2012-02-14-05-57-31.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津久井久美子 (Kumiko Nakada-Tsukui)

国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官

研究者番号: 00420092

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし