

令和元年6月21日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08761

研究課題名(和文)腸管寄生原虫の病原性発現機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of pathogenicity of intestinal protozoa

研究代表者

加藤 健太郎 (KATO, Kentaro)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：50508885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)および非病原性の*E. dispar*のレクチン(IgI)にはIgI1とIgI2のアイソフォームがあり、すべてに溶血活性があった。*E. histolytica*と*E. dispar*ではEhIgI2とEdIgI2の発現量は同等だが、EhIgI1の発現量がEdIgI1よりも高い。*E. histolytica*のEhIgI1発現抑制株では、親株と比較して溶血活性が低く、EhIgI1の発現量が*E. histolytica*の溶血活性に影響を与えることが示された。また、EhIgIのアミノ酸配列の中の60アミノ酸に溶血活性部位が存在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)のIgIのC末端側に溶血活性ならびに細胞障害性が存在することを明らかにしており、その発現量が溶血活性に影響を与えることを明らかにできた。このことより、EhIgI1のC末端側を抗体あるいは薬剤でブロックすれば*Entamoeba histolytica*の溶血活性を抑制でき、感染予防と発症を同時に行うことができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： *Entamoeba histolytica* and non-virulent *Entamoeba dispar* lectins (IgIs) have 2 isoforms, IgI1 and IgI2, and both isoforms showed hemolytic activities. The expression levels of IgI2 in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are equivalent but those of IgI1 are higher in *Entamoeba histolytica* than in *Entamoeba dispar*. Therefore, we attenuated expression of IgI1 in *Entamoeba histolytica* utilizing a gene-silencing technique and evaluated the effect on hemolytic activity. The gene-silenced strain had less hemolytic activity compared with that of wild type indicating that the expression level of IgI1 affected the hemolytic activity of *Entamoeba histolytica*.

The hemolytic activity resided in 60 amino acids of IgI1 was confirmed from the hemolytic assay using recombinant fragment proteins of IgI1.

研究分野：寄生虫学、糖鎖生物学

キーワード：赤痢アメーバ レクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アメーバ赤痢は、熱帯・亜熱帯病のひとつである。全世界で 5000 万人が、その原因寄生原虫である赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)に感染しており、年間 4~10 万人がアメーバ赤痢により死亡している。通常は腸管感染により赤痢様の下痢などを引き起こすが、重篤化した場合は肝膿瘍・赤痢アメーバ性脳膿瘍などにより宿主を死に至らしめることもある。赤痢アメーバはその嚢子が飲料水や食物を介してヒトの体内に入り、小腸で脱嚢して栄養体となり、大腸にて感染する。この大腸での感染において、赤痢アメーバ表面に存在する Gal/GalNAc レクチンが必須である。赤痢アメーバはこの分子を介して、ヒト大腸腸管上皮に存在する高度に糖鎖修飾を受けているムチンに接着し、感染が成立する。

赤痢アメーバレクチンは 3 つのサブユニットからなることが報告されており、それぞれ Heavy(Hgl)、Light(Lgl)および Intermediate(Igl)レクチンと名前がついているが、実際に糖鎖認識能を有し、赤痢アメーバ感染に必須なことが示唆されているのは Hgl と Igl である。

Hgl は 1987 年に Gal-agarose への親和性ならびに赤痢アメーバの宿主細胞への接着を阻害する抗体を用いて精製されたレクチンである。Igl も 1998 年に同様に宿主細胞への接着を阻害する抗体を用いて精製され、その後 Gal に対する親和性が認められたレクチンである。

Hgl に関しては様々な研究が長年行われてきているにも関わらず、機能領域および作用機序に関して不明な点が多い。また現在、アメーバ赤痢に対するワクチンとしての応用が試みられているが、効果に関しては結論が出ていない。一方で、Igl に関しては赤痢アメーバ感染を検出する血清診断用抗原としての可能性が示されているものの、その機能領域ならびに作用機序に関してはほとんど判っていない。研究代表者は Igl のレクチン領域を探索している際に、この分子に溶血活性ならびに細胞障害活性が存在することを見出した[Kato K et al., *Sci. Rep.*, 5, 13901 (2015)]。

赤痢アメーバは接着依存的に溶血活性や細胞障害活性を有することが知られており、その活性の一部を担っているのは、アメーバ内小胞に存在する Amoebapore であると考えられてきた。赤痢アメーバレクチンが細胞と接着し、何かしらの刺激が赤痢アメーバに入り、アメーバ内小胞にある Amoebapore が放出され、接着した細胞に障害性を示す、というのが提唱されていた仮説であった。しかし、赤痢アメーバ表面に存在する Igl レクチンそのものに溶血活性および細胞障害活性が認められたことにより、Igl レクチンにより直接、接着細胞が障害を受けるという新しい仮説を提唱することができた。

しかしながら、これらは組換え型 Igl レクチンを用いた研究結果であるため、赤痢アメーバ表面で実際に Igl がどのような制御を受けて、これらの病原性発現に寄与しているのかは、不明であった。

2. 研究の目的

アメーバ赤痢の原因寄生原虫である赤痢アメーバには全世界で 5000 万人が感染し、本邦でも患者数が増加傾向にある。赤痢アメーバに感染しても発症しない場合があり、その病原性発現機構は不明である。糖鎖認識分子であるアメーバレクチンが、感染に必須であることが知られており、研究代表者は、そのレクチンのサブユニットの 1 つに溶血ならびに細胞障害活性があることを見出している。しかし、そのレクチンがどのように制御されて、赤痢アメーバの病原性に関わっているのかは未だ不明である。本研究の目的は、このレクチンのサブユニットが、どのような制御を受けて、赤痢アメーバの病原性に関わっているのか、明らかにすることである。

3. 研究の方法

赤痢アメーバが宿主細胞へ接着する際に必須のレクチンであり、溶血活性および細胞障害活性を有する Igl サブユニットの活性領域を同定するために、Igl サブユニットのフラグメントを作製し、溶血ならびに細胞障害実験を行う。また、そのフラグメントに対するモノクローナル抗体を作製し、実際に赤痢アメーバの溶血活性および細胞障害活性が阻害できるか検証することにより、活性中心および Igl サブユニットのそれら活性における役割を明らかにする。さらに、GPI アンカー型タンパク質である Igl サブユニットが赤痢アメーバ膜から遊離されることが、溶血活性および細胞障害活性発現のために重要であるか否かを、ホスホリパーゼ阻害剤を用いて検討する。

(1) Igl サブユニットの溶血活性および細胞障害活性を有する領域の同定

組換え型 Igl を用いて、赤痢アメーバレクチンが有する Igl サブユニットの C 末端領域に溶血活性および細胞障害活性を認めているため[Kato K et al., *Sci. Rep.*, 5, 13901 (2015)]、C 末端領域のフラグメントを His-tag 付き組換え型タンパク質として作製し、大腸菌で発現する。組換え型タンパク質は Ni カラムで精製し、実験に用いる。

溶血活性は組換え型 Igl とウマ赤血球とを混合し、室温で静置し、一定時間後の遊離ヘモグロビン濃度を定量することで評価する。

細胞障害活性は組換え型 Igl とヒト大腸癌細胞株 LS174T 細胞あるいは Caco-2 細胞とを 37 で共培養し、一定時間後の生細胞を計数することで評価する。

この過程を溶血活性ならびに細胞障害活性が認められなくなるまで行い、溶血活性ならびに細胞障害活性に必要な最小アミノ酸配列を決定する。

(2) Igl サブユニットの活性領域に対する抗体による活性中心の検証

(1)で同定された溶血活性および細胞障害活性に関与するアミノ酸配列を含む Igl フラグメントをアジュバントとともにマウスに免疫し、追加免疫後にマウス脾臓を摘出する。

脾臓細胞をミエロマ細胞と細胞融合することにより、ハイブリドーマを作製する。

ハイブリドーマをスクリーニングし、目的の Igl フラグメントに対するモノクローナル抗体産生クローンを選別する。Igl フラグメントの構造依存的に抗体の親和性が異なる可能性があるため、クローンの選別にはウェスタンブロット、ドットブロットおよび赤痢アメーバの免疫染色を用いる。選別されたクローンから産生されるモノクローナル抗体を用いて、組換え型 Igl サブユニットおよび赤痢アメーバの溶血活性および細胞障害活性を阻害できるか検証する。

溶血活性に対する抗体による阻害は、モノクローナル抗体を前処理した組換え型 Igl あるいは赤痢アメーバとウマ赤血球とを混合し、室温で静置し、一定時間後の遊離ヘモグロビン濃度を定量することで評価する。

細胞障害活性に対する抗体による阻害は、モノクローナル抗体を前処理した組換え型 Igl あるいは赤痢アメーバとヒト大腸癌細胞株 LS174T 細胞あるいは Caco-2 細胞とを 37 で共培養し、一定時間後の生細胞を計数することで評価する。

(3) Igl サブユニットの作用機序の解明

Igl サブユニットは GPI アンカー型タンパク質であり、赤痢アメーバのホスホリパーゼにより、ホスファチジルイノシトールで切断され、細胞膜から遊離する可能性がある。ホスホリパーゼの中でも、ホスホリパーゼ A2 の赤痢アメーバの病原性への関与が示唆されているため [Ravdin JI et al., *J. Infect. Dis.*, 152, 542-549 (1985), González-Garza MT et al., *Exp. Parasitol.*, 96, 116-119 (2000)], ホスホリパーゼ A2 に対する阻害剤を用いて検討する。

赤痢アメーバ培養液中に Igl サブユニットが存在することを、(2)で作製したモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットにより確認する。

市販の分泌型あるいは細胞質型ホスホリパーゼ A2 阻害剤を用いて、その共存下および非共存下で赤痢アメーバを培養し、培養液中の Igl サブユニットの存在量をウェスタンブロットで比較する。同時に、阻害剤存在下あるいは非存在下で培養した赤痢アメーバによる溶血活性および細胞障害活性を比較する。

溶血活性に対するホスホリパーゼ A2 阻害剤の影響は、阻害剤で前処理した赤痢アメーバとウマ赤血球とを混合し、室温で静置し、一定時間後の遊離ヘモグロビン濃度を定量することで評価する。

細胞障害活性に対するホスホリパーゼ A2 阻害剤の影響は、阻害剤で前処理した赤痢アメーバとヒト大腸癌細胞株 LS174T 細胞あるいは Caco-2 細胞とを 37 で共培養し、一定時間後の生細胞を計数することで評価する。

4. 研究成果

[研究の主な成果]

(1) Igl サブユニットの溶血活性および細胞障害活性を有する領域の同定

Igl サブユニットの C 末端側のフラグメントを大腸菌にて作製し、溶血活性を測定したところ、EhIgl のアミノ酸 787-846 の領域に溶血活性が存在することが明らかとなった (図 1)。

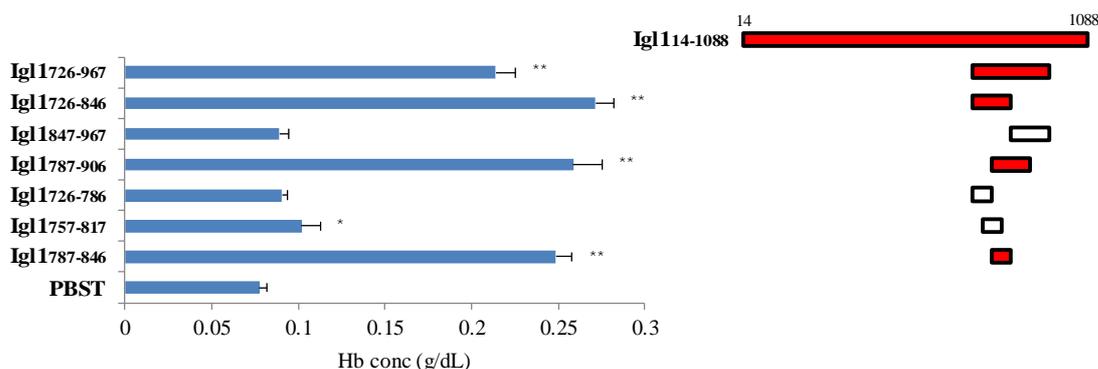


図 1 Igl サブユニットの C 末端側フラグメントの溶血活性
溶血活性を示したフラグメントは赤色で示した。

本領域は *Entamoeba* 属の Igl 分子のみが有するアミノ酸配列である可能性が高く、この領域を標的とした抗体あるいは薬剤により、赤痢アメーバが有する病原性を抑えることができると考える。現在、さらに溶血活性領域の絞り込みを行っており、細胞障害性に関する検討は今後行う。

また、本研究を遂行する過程で、非病原性である *Entamoeba dispar* が有する Igl にも溶血活性があることを明らかにし、Igl の発現量が赤痢アメーバの溶血活性に影響を与えることを明らかにした [Kato K et al., *PLoS ONE*, 12, e0181864 (2017)]。

(2) Igl サブユニットの活性領域に対する抗体による活性中心の検証

Igl の組換え型タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製は、溶血活性部位を 30 アミノ酸程度に絞り込めた後に行うこととし、本実験では東海大学の橘教授から供与頂いたモノクローナル抗体を用いて実験を行った。Igl サブユニットの立体構造、N 末端側、あるいは中央部ならびに C 末端側を認識する抗体を全長 Igl に作用させ、その後に溶血活性測定を行った (図 2)。

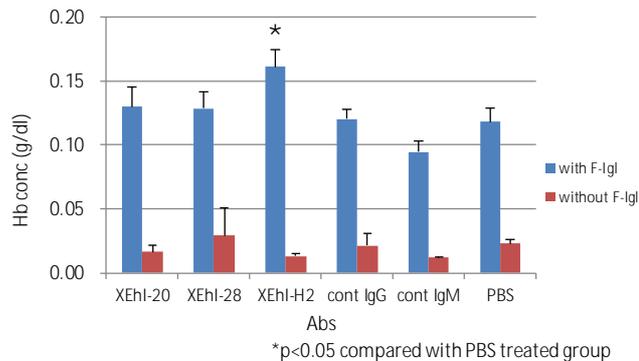


図 2 モノクローナル抗体を用いた溶血活性中心の検証

その結果、予想に反して中央部ならびに C 末端側を認識する抗体により Igl サブユニットの溶血活性が高くなった。このことは、その抗体により溶血活性部位が多量体化したためと考えられる。

(3) Igl サブユニットの作用機序の解明

(2) で用いた抗体により、赤痢アメーバ培養液中の Igl を検出しようと試みたが、現在までのところ検出できていないため、その後のホスホリパーゼ阻害剤を用いた検討を行っていない。

[得られた成果の国内外における位置づけとインパクト]

研究代表者は今までに赤痢アメーバの Igl サブユニットに溶血活性ならびに細胞障害性が存在することを見出している。本研究においては、溶血活性部位の同定を試みた。現在までに 60 アミノ酸までに絞り込むことができ、今後さらに絞り込みを進める予定である。その研究過程で、非病原性の *Entamoeba dispar* が有する Igl サブユニットにも溶血活性があることを見出し、Igl の発現量が赤痢アメーバの病原性に寄与していることを明らかにした [Kato K et al., *PLoS ONE*, 12, e0181864 (2017)]。このことは、Igl サブユニットの活性部位をブロックする、あるいは Igl サブユニットの発現量を抑制することができれば、赤痢アメーバの病原性を抑えることができることを示唆している。Igl サブユニットに対するモノクローナル抗体が、Igl サブユニットの溶血活性を高める場合があったことから、Igl サブユニットが赤痢アメーバの溶血活性に寄与することを改めて確認できた。これらの内容は国内外で初めて研究代表者が明らかにしたことである。

[今後の展望]

赤痢アメーバの Igl サブユニットの溶血活性部位をさらに絞り込み、その部位に対するモノクローナル抗体、薬剤、合成糖タンパク質などで赤痢アメーバの病原性を抑えることができるか検討する。また、赤痢アメーバの Igl サブユニットの発現量を低下させるために、Igl サブユニットの発現機構を明らかにする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Kato K, Makiuchi T, Cheng X, Tachibana H; Comparison of hemolytic activity of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* lectins. *PLoS One*, 査読有, 12, e0181864 (2017)
DOI: 10.1371/journal.pone.0181864

[学会発表](計 11 件)

Kentaro Kato, Takashi Makiuchi, Hiroshi Tachibana; 赤痢アメーバレクチン Igl1 サブユニットの溶血活性領域の同定, 第 88 回日本寄生虫学会大会 (2019)

加藤 健太郎, 牧内 貴志, 橘 裕司; 赤痢アメーバレクチン Igl サブユニットの溶血活性領域の同定, 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)

喜田 宏, 鈴木 定彦, 澤 洋文, 川口 寧, 松浦 善治, 飯田 哲也, 加藤 健太郎; 感染症克服を目指したオールジャパン戦略, サイエンスアゴラ 2018 (2018)

加藤 健太郎, 牧内 貴志, 程 訓佳, 橘 裕司; *Entamoeba histolytica* Igl レクチンの役割,

第 37 回日本糖質学会年会 (2018)

Kentaro Kato, Takashi Makiuchi, Xunjia Cheng, Hiroshi Tachibana; Comparison of hemolytic activity of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* lectins, 第 87 回日本寄生虫学会大会 (2018)

Kentaro Kato; The role of intermediate subunits of *Entamoeba histolytica* lectin, The U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program : The 48th Joint Conference on Parasitic Diseases (2018)

加藤 健太郎, 牧内 貴志, Xunjia Cheng, 橘 裕司; Entamoeba レクチンの Igl サブユニットが有する溶血活性に関する研究, 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017)

加藤 健太郎, 牧内 貴志, Cheng Xunjia, 橘 裕司; Entamoeba 属の Igl レクチンの溶血活性比較研究, 第 36 回日本糖質学会年会 (2017)

加藤 健太郎, 牧内 貴志, Xunjia Cheng, 橘 裕司; *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の Igl レクチンの溶血活性比較研究, 第 86 回日本寄生虫学会大会 (2017)

加藤 健太郎, 牧内 貴志, 橘 裕司; *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の Igl レクチンの活性比較研究, 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016)

加藤 健太郎, 橘 裕司; *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* レクチンの活性比較研究, 第 35 回日本糖質学会年会 (2016)

〔図書〕(計 1 件)

入村 達郎, 加藤 健太郎, 佐藤 佳代子, 築地 信, 伝田 香里(共訳), 東京化学同人, 感染と免疫(第 4 版), 2017 年, 162-222

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

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。