

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2023

課題番号：18KK0451

研究課題名（和文）腸管寄生原虫の病原性因子間相互作用および新規糖鎖アレイによる因子の糖鎖親和性解析

研究課題名（英文）Analysis of virulent factor interactions of intestinal protozoa and assessment of lectin activity of *Entamoeba histolytica* lectin using a cell-based glycan array

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） 11,400,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：腸管寄生原虫である赤痢アメーバが有する糖鎖認識分子（レクチン）に関して、他の病原性因子と相互作用をしているか明らかにしようと試みた。赤痢アメーバレクチンが相互作用しているタンパク質は同定できていないが、レクチンがエクソソームに存在することを見出した。その過程で、赤痢アメーバレクチンに溶血・細胞傷害性を有する領域が3つ存在することを明らかにした。また、赤痢アメーバレクチンの糖鎖親和性は弱く、認識糖鎖が明らかでなかったため、異なる糖鎖を発現している細胞を用いて同定しようと試みたが、非特異的な吸着が多く、親和性を測定できなかった。希少糖により赤痢アメーバの増殖を抑制できることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤痢アメーバIglレクチンサブユニットと相互作用する病原性因子の存在がわかり、この病原性因子を明らかにすることで、赤痢アメーバが病原性を発現する機構が明らかとなる。Iglの断片がエクソソーム中に存在することが示唆され、赤痢アメーバの病原性発現へのIglの関与が考えられる。Iglには溶血および細胞傷害性を有する領域が複数あり、Iglの活性を抑制するためには、すべての領域を阻害する必要があることを示せた。Iglは細胞への非特異的な吸着が強く、Iglの糖鎖親和性を明らかにするには別の方法が必要であることが示された。赤痢アメーバの増殖を希少糖が抑制し、このことは赤痢アメーバ症への新薬開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：In this project, I tried to identify virulence factors that interact with *Entamoeba histolytica* Igl lectin subunits. The virulence factors that interacted with Igl could not be identified due to the amount even though an interaction between Igl and another lectin subunit, Hgl, was confirmed by western blotting. In the process, I found that Igl fragments were in exosome fractions from *E. histolytica* culture supernatant and Igl had three regions for its hemolytic and cytotoxic activities.

Igl is known to have a very weak affinities toward glycans. Therefore, I tried to identify the glycans recognized by Igl by using "Cell-based glycan array". As the results, Igl showed non-specific binding to the cells that had different glycans on the cell surfaces and I could not clarify the glycans that specifically recognized by Igl.

I found that rare sugars could inhibit the growth of *E. histolytica* trophozoites in vitro.

研究分野：寄生虫学

キーワード：赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* レクチン Iglサブユニット Hglサブユニット エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

アメーバ赤痢の原因寄生原虫である赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)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、病原性発現機構は不明であった。その感染過程において、糖鎖認識分子であるアメーバレクチンが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傷害活性があることを見出していた。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った。基課題「腸管寄生原虫の病原性発現機構の解明(課題番号: 16K08761)」の研究目的は、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を明らかにすることであった。研究方法としては、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傷害活性を有する 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、溶血ならびに細胞傷害実験を行っていた。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傷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しようとして試みていた。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傷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していた。

Igl サブユニットの溶血および細胞傷害活性領域は 60 アミノ酸にまで絞り込めていた。また、非病原性である *Entamoeba dispar* の Igl サブユニットも、組換え型タンパク質を用いた場合、溶血活性を有することを明らかにし、Igl サブユニットの発現量が *Entamoeba histolytica* の溶血活性に關与していることを gene-silencing 法を用いて明らかにしていた [Kato K et al., PLoS One, 12, e0181864 (2017)].

## 2. 研究の目的

本国際共同研究の目的は、基課題の目的を進展させ、赤痢アメーバレクチンのサブユニットの一つである Igl が、赤痢アメーバの他の病原性因子とどのように相互作用しているか明らかにすることである。また、基課題の研究過程で、Igl サブユニットの糖鎖親和性が低いことが明らかとなったため、感度の高い糖鎖親和性検出能を有する解析方法を用いて Igl サブユニットの糖鎖親和性を明らかにすることも目的とした。そのために、Igl サブユニットと他の病原性因子との相互作用について、アメリカ合衆国バージニア大学にて研究を行った。また感度の高い糖鎖親和性解析法に関しては、デンマーク王国コペンハーゲン大学で開発中の糖鎖アレイ(Cell-based glycan array)を用いた。これらの結果を基に将来的に赤痢アメーバに対する診断法や治療法の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

基課題においては、Igl サブユニットのみに着目して研究を進めているが、実際の赤痢アメーバ表面においては他の分子と相互作用している可能性が高く、他のレクチン(Hgl)との相互作用は示唆されているものの、その様式は明らかとなっていなかった。そこで研究代表者は、Hgl サブユニットを同定したアメリカ合衆国・バージニア大学の Petri 教授の下で Igl サブユニットと Hgl サブユニットの分子間相互作用様式を明らかにし、その相互作用が赤痢アメーバの病原性発現に寄与しているか明らかにしようとした。具体的には、赤痢アメーバのライセートから抗 Igl モノクローナル抗体を用いて Igl サブユニットを免疫沈降し、その際に共沈してくるタンパク質をゲル内消化し、ペプチド断片を MALDI-TOF/TOF 解析し、Igl サブユニットに親和性があるタンパク質の同定を試みた。

また、基課題の研究を進めている過程において、Igl サブユニットが有する糖鎖親和性が非常に低いという結果が得られ、既存の糖鎖アレイよりも高感度の糖鎖アレイの開発が必要であると考えられた。その際に、デンマーク王国・コペンハーゲン大学の Clausen 教授の研究室において、細胞を用いた糖鎖アレイ(Cell-based glycan array)を開発中であるという情報を得たため、その開発に協力すると同時に、Igl サブユニットの糖鎖親和性を新規糖鎖アレイにより解析したいと考えた。Cell-based glycan array を用いることができれば、形態では判別不可能な、病原性の *Entamoeba histolytica* と非病原性の *Entamoeba dispar* とを区別できる可能性があり、新規診断法への応用が考えられた。また、Igl サブユニットには細胞傷害性があるため、Cell-based glycan array を用い、発現している糖鎖の違う細胞間で、Igl サブユニットの細胞傷害性に対する感受性の違いが認められるという新知見が得られる可能性があった。

## 4. 研究成果

### Igl サブユニットと相互作用を示す分子の同定

抗 Igl モノクローナル抗体を用いて Igl サブユニットと共沈してくるタンパク質を SDS-PAGE により分離し、クーマシー染色および銀染色で確認したところ、Igl サブユニット由来以外のバンドを確認することができた。しかしながら、タンパク質をゲル内消化した後の MALDI-TOF/TOF 解析では Igl 自体も同定することができなかった。Igl と共沈してきたタンパク質に Hgl サブユニットが含まれることは抗 Hgl 抗体を用いたウェスタンブロットティングにより確認

できたため、MADLI-TOF/TOF 解析を行うにはタンパク量が不十分であった可能性がある。また、本研究を進めている過程で、Igl サブユニットの断片が赤痢アメーバ培養上清に存在することを見出し、それらの断片がエクソソームにあるという、予備的実験結果を得ることができた[未発表]。今後は Igl サブユニットの断片がどのようなエクソソームタンパク質と相互作用をしているのかを、引き続きバージニア大学と共同で研究していく予定である。

#### **Igl サブユニットの溶血および細胞傷害活性領域**

本研究開始当初までに、Igl サブユニットの溶血および細胞傷害活性に関与する領域は 60 アミノ酸にまで絞り込めていた。本研究課題を進めている過程で、組換え型 Igl を用いた研究を行い、Igl サブユニットの少なくとも 3 つの領域がこれらの活性に関与することを明らかにすることができた[Kato K et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 7700 (2022)]。

#### **Cell-based glycan array を用いた Igl サブユニットの糖鎖親和性解析**

コペンハーゲン大学で開発中であった糖鎖アレイ (Cell-based glycan array) [Narimatsu Y et al., *Mol. Cell*, 75, 394-407 (2019)] を用いて Igl サブユニットの糖鎖親和性解析を試みた。遺伝子操作により、GalNAc, Core1 (Gal-GalNAc), Core 3 (GlcNAc-GalNAc) あるいは sTn (Sial-GalNAc) を主に発現している HEK293 細胞をアセトン固定し、組換え型 Igl サブユニットを添加した。糖鎖に結合した Igl サブユニットの検出には抗 His-tag 抗体あるいは抗 Igl モノクローナル抗体 (XEhI-20, XEhI-28) を用いた。組換え型 Igl サブユニットはいずれの糖鎖にも親和性を示し、非特異的な接着を排除できない結果が得られた[未発表]。今後は糖鎖を結合したナノ粒子を用いて、Igl サブユニットの糖鎖親和性を解析する予定である。

#### **希少糖を含む単糖が赤痢アメーバ増殖に与える影響**

Igl サブユニットは糖鎖認識分子であり、赤痢アメーバが粘膜や細胞に接着する際に重要な分子である。本研究課題を進める過程で、赤痢アメーバがエネルギー源として使えない単糖で、赤痢アメーバの接着および増殖を阻害することができる単糖の探索を行った。グルコース、ガラクトース、フルクトース、希少糖 (アロースおよびブシコース) のうち、赤痢アメーバはグルコース、ガラクトースをエネルギー源として用いることができた。赤痢アメーバがエネルギー源として用いることができるか議論されてきたフルクトースは、培養液中の量が減少しないことから、「用いることができない」と結論付けることができた。さらに希少糖は赤痢アメーバ中の活性酸素量を増加させることで積極的に増殖抑制することを示すことができた[Kato K et al., *Front. Mol. Biosci.*, 10, 1288470 (2023)]。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kato Kentaro, Miura Mitsumasa, Tachibana Hiroshi, Tsukamoto Ikuko	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of monosaccharides including rare sugars on proliferation of Entamoeba histolytica trophozoites in vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1288470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2023.1288470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kato Kentaro, Tachibana Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification of Multiple Domains of Entamoeba histolytica Intermediate Subunit Lectin-1 with Hemolytic and Cytotoxic Activities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7700 ~ 7700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23147700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加藤健太郎, 新地浩之, 隅田泰生, 橘裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバレクチンのIglサブユニットは界面活性を有している
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kentaro Kato, Takashi Makiuchi, Hiroyuki Shintchi, Audrey C. Brown, Yasuo Suda, Hiroshi Tachibana, William A. Petri Jr.
2. 発表標題 Function and localization of intermediate subunit of Entamoeba histolytica lectin
3. 学会等名 XX International Seminar on Amebiasis 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 健太郎
2. 発表標題 寄生虫感染における糖鎖関連分子の役割
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 健太郎、橘、裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバIgI1レクチンは溶血および細胞傷害活性領域を複数有する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤 健太郎、橘 裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバIgI1レクチンは溶血および細胞傷害活性領域を複数有する
3. 学会等名 第4回卓越大学院プログラム日英グローバルヘルスシンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤 健太郎、花松 久寿、古川 潤一、畠山 智充、橘 裕司
2. 発表標題 Entamoeba histolytica IgI1レクチンの分子サイズは培養条件により異なる
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 健太郎、花松 久寿、古川 潤一、畠山 智充、橘 裕司
2. 発表標題 腸管寄生原虫Entamoeba histolytica のIgI1 レクチンの分子サイズは培養条件により異なる
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤健太郎、牧内貴志、橘裕司
2. 発表標題 赤痢アメーバIgIレクチンの溶血活性領域の同定
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤健太郎
2. 発表標題 Beyond antibiotics--赤痢アメーバ感染制御に向けた生物学
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
ペトリ ウィリアム  (Petri Jr. William)	バージニア大学・School of Medicine・教授	
クラウゼン ヘンリック  (Clausen Henrik)	コペンハーゲン大学・Dept. Cell. Mol. Med.・教授	

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
ブラウン オードリ  (Brown Audrey)		
成松 由規  (Narimatsu Yoshiki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

デンマーク	コペンハーゲン大学			
米国	バージニア大学			