

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07531

研究課題名(和文) 原虫における小胞体シグナルペプチドに依存しない新規分泌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Novel secretion mechanisms from ER independent of signal peptide in protozoan parasites

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：N末端シグナルペプチドは小胞体からのタンパク質輸送に必要である。しかしシグナルペプチドが無くとも細胞外に分泌されるタンパク質は原虫や宿主細胞で複数報告されている。本研究では、小胞体に局在する赤痢アメーバのRab8A GTPaseによってEhToIAが細胞表面に輸送されることを示した。EhToIAはN末端にミリスチル化修飾を受けることが輸送に必要なと考えられた。またマラリア原虫でも、小胞体に局在するミリスチル化PfRab5bが、ミリスチル化される基質のAK2を寄生胞膜への輸送に関与していること、またPfRab5bの輸送制御に関わる結合因子の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

寄生性原虫は宿主表面の抗原を認識・接着した後に細胞侵入を開始するため、原虫の細胞表面への表面抗原の輸送機構の解明は重要である。本申請課題で解析を行った赤痢アメーバとマラリア原虫は共に国内外で感染者が多く、感染防御の機構解明が必要である。本研究結果により赤痢アメーバとマラリア原虫は、共に特殊な細胞内輸送系を獲得していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The N-terminus signal peptide of secreted proteins is required for the protein to be transported out of the endoplasmic reticulum. However, several secreted proteins without a signal peptide have been reported in protozoa and host cells. In this study, I showed that EhToIA is transported to the cell surface by the endoplasmic reticulum-localized Rab8A GTPase in Entamoeba histolytica. N-terminal myristylation modification of EhToIA was necessary for transport to the amebic cell surface. In addition, myristoylated PfRab5b GTPase, which is localized to the ER, is involved in the transport of myristoylated substrate, AK2, to the parasitophorous vacuolar membrane in Plasmodium falciparum. The regulatory factors involved in the regulation of PfRab5b were also analyzed.

研究分野：細胞生物学

キーワード：赤痢アメーバ マラリア原虫 Rab GTPase メンブレントラフィック

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外へのタンパク質輸送は、分泌タンパク質の N 末端にシグナルペプチドがあることが小胞体からの輸送に必要である。しかしシグナルペプチドが無くとも細胞外に分泌されるタンパク質は原虫や宿主細胞で複数報告されている。

2. 研究の目的

一般的な真核生物の細胞内輸送では、シグナルペプチドを有するタンパク質は Sar1 GTPase の制御により、COPII 小胞を介してゴルジ体に輸送される。しかし赤痢アメーバとマラリア原虫にそれぞれ EhRab8A と PfRab5b という独自の Rab GTPase が小胞体に局在し、それらの局在が Sar1 GTPase/COPII 小胞とは異なることが報告されている。よって、原虫独自の輸送経路の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

赤痢アメーバの EhRab8A 依存的に細胞表面に輸送されるタンパク質を、細胞表面のビオチン化と質量解析によって単離した。得られた候補タンパクが細胞表面に輸送されることを、タグを付加した形質転換アメーバ株の作成と、蛍光抗体染色によって確認した。候補タンパク質の機能を、発現抑制株の作成によって確認した。

マラリア原虫の PfRab5b の結合タンパク質候補として PfArf1, PfRab1b, PfSec7 が単離されている。それぞれの候補タンパク質が PfRab5b 依存的に輸送されるかどうかを、PfRab5b の GTP 固定、ならびに GDP 固定型変異との共発現株を作成し、候補タンパク質の輸送阻害を蛍光抗体法によって観察した。

4. 研究成果

赤痢アメーバの EhRab8A 発現抑制株と、野生株との細胞表面プロファイル比較を行うことにより、EhRab8A 発現抑制株で細胞表面への提示が低下する EhTo1A を候補として得た。EhTo1A には、赤痢アメーバゲノムに他に 5 つのホモログが存在していたが、EhTo1A 特異的な発現抑制株を作成することが可能であった。EhTo1A の表現系として、赤血球への接着が低下すること、またプラスチックプレートへの接着低下も観察された。しかし、コラーゲンコートプレートへの接着は影響を受けなかったため、細胞接着の特異性を認識していると考えられた。定常状態での To1A の局在を観察するために、内部のコイルドコイル領域に FLAG タグを挿入し、発現誘導可能なプロモーターの下流で発現させる赤痢アメーバ形質転換株を作製した。抗 FLAG 抗体で染色した To1A の細胞内局在は、phagocytic cup であり、赤血球を捕獲した非常に初期の phagosome に局在していた。また、細胞辺縁の To1A の局在はファロイジンで染色される F-Actin と共同在していた。To1A は細胞表面にも検出されるのに関わらず、シグナルペプチドと膜貫通ドメインが存在しない。2 番目のアミノ酸がミリスチル化修飾を受けると予測されるグリシンであるため、このグリシン残基をアラニン置換することで、To1A の細胞辺縁への局在が阻害された。よって To1A はミリスチル化を受け、細胞辺縁への集積に必要であることが分かった。

マラリア原虫の小胞体に局在する Rab5b GTPase (PfRab5b) が、同じく N 末端にミリスチル化修飾を受ける AK2 タンパク質の輸送に関与していることが明らかになっている。PfRab5b の輸送メカニズムを明らかにするために、共免疫沈降と質量解析によって結合タンパク質の単離を試み、PfArf GTPase、PfRab1b, PfSec7 を候補として得た。候補タンパク質のうち PfArf GTPase は N 末端がミリスチル化修飾をうける。PfArf と PfRab5b との二重発現株を作成し、PfArf はマラリア原虫の小胞体近傍で PfRab5b と共同在していることを確認した。PfRab5b の変異型を発現させると、ミリスチル化 AK2 の輸送が阻害されることが報告されている。そこで PfArf の変異型を発現しても、AK2 の輸送が阻害され細胞内に蓄積することを示した。別の候補タンパク質の PfRab1b の変異型を発現した際には、AK2 の輸送阻害は観察されなかった。よって、マラリア原虫でもシグナルペプチドに依存しない輸送経路を解明することができた。

PfArf1 による細胞外タンパク質の輸送がシグナルペプチドを有する輸送タンパク質には影響がないことを確認した。マラリア原虫の赤血球に輸送されるタンパク質にはシグナルペプチドの下流に PEXEL (plasmodium export element) モチーフを有する。その 1 つの PEXEL タンパク質である Rifin (PlasmoDB accession number, PFA0745w) の PEXEL 領域の直後に RFP を融合させた fusion タンパク質の輸送が PfArf1 に調節されているかどうかを検討した。その結果、Rifin-RFP の感染赤血球への輸送は、GDP 型 PfArf1 と共発現させることにより、原虫細胞内へと蓄積

した。また、PfArf1と同様にPfRab5b結合タンパク質として単離されているPfRab1bのGDP型を発現させた場合でも、Rifin-RFPの細胞外への輸送は阻害された。小胞体近傍に局在するPfRab5bがエフェクターを介してPfArf1を活性化し、AK2の詰め込みと寄生胞膜への輸送を担う。その後PfArf1が局在する膜は成熟しPfRab1bと相互作用する。最後にPfRab1bは小胞体から輸送されたRifinをゴルジ体へと輸送するモデルが考えられた。

最後に、Sec7ドメインを含むタンパク PF3D7_1442900の解析を行った。他種生物でSec7はArf1 GTPaseのguanine nucleotide exchange factor グアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と機能を持ち、GDP型のArf1をGTP型へと活性化する働きがある。ヒトにはSec7ドメインはタンパク質は複数ゲノムに存在するが、マラリアのSec7はゲノムに1つしか存在せず、ヒトSec7よりも倍の400kDaの大きさを持つ。PF3D7_1442900は中央にSec7ドメイン、N末にARMドメイン(Armadillo repeat)、C末はマラリア種間で保存した配列が存在した。マラリアのSec7の機能を解析するために、Plasmodium berghei Sec7にC末端側にmCherryを融合させたPbSec7-mcherryを発現させる原虫株をsingle crossover法で作成した。赤内期ではmCherryのシグナルは核周辺のドット状構造を示し、赤内期の進行とともにシグナルのドットの数が多くなった。赤内期の原虫ライセートを還元状態のNuPAGEゲルで泳動を行い、抗mCherry抗体でウエスタンプロットを行うと、400kDaのサイズのバンドが得られ、全長のPbSec7-mCherryが発現していることが分かった。また、非還元状態のBN-PAGEゲルで泳動すると、800kDaのサイズのバンドが得られ、細胞内でPbSec7は二量体を形成、あるいは他のタンパク質と相互作用していることが示された。PbSec7がPfArf1と相互作用していることを確認するために、PbSec7-mCherryとPfArf1-mAGを同時に発現する二重発現株を作成したところ、両者のシグナルは核近傍で一致した。よって、ミリストイル化Rab5bの結合タンパク質Sec7とArf1は、核近傍で輸送調節を行っていることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yanagawa Yasuaki, Izumiyama Shinji, Saito-Nakano Yumiko, Nakada-Tsukui Kumiko, Kobayashi Seiki, Yoshida Naoko, Kikuchi Yoshimi, Gatanaga Hiroyuki, Oka Shinichi, Nozaki Tomoyoshi, Watanabe Koji	4. 巻 18
2. 論文標題 Gene expression of axenically-isolated clinical Entamoeba histolytica strains and its impact on disease severity of amebiasis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1010880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1010880	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 Saito-Nakano Yumiko, Umeki Yuko, Shimokawa Chikako, Kobayashi Koichi, Hashimoto Koichi, Takada Toshio, Makii Chinami, Hasebe Rie, Yoshida Yuri, Nakajima Riko, Kobayashi Seiki, Hisaeda Hajime	4. 巻 7
2. 論文標題 Prevalence and metronidazole resistance of Trichomonas vaginalis among Japanese women in 2021	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 IJID Regions	6. 最初と最後の頁 130 ~ 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijregi.2023.02.007	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 Lozano-Mendoza J, Ramirez-Montiel F, Rangel-Serrano A, Paramo-Perez I, Mendoza-Macias C, Saavedra-Salazar F, Franco B, Vargas-Maya N, Jeelani G, Saito-Nakano Y, Anaya-Velazquez F, Nozaki T, Padilla-Vaca F	4. 巻 12
2. 論文標題 Attenuation of In Vitro and In Vivo Virulence Is Associated with Repression of Gene Expression of AIG1 Gene in Entamoeba histolytica	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 489 ~ 489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens12030489	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 該当する

1. 著者名 Saito-Nakano Yumiko, Makiuchi Takashi, Tochikura Mami, Gilchrist Carol A., Petri William A., Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 ArfX2 GTPase Regulates Trafficking From the Trans-Golgi to Lysosomes and Is Necessary for Liver Abscess Formation in the Protozoan Parasite Entamoeba histolytica	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 794152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.794152	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 該当する

1. 著者名 Wada Akira, Umeki Yuko, Annoura Takeshi, Saito-Nakano Yumiko	4. 巻 8
2. 論文標題 <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> Antiamebic Activity of Iron-Targeting Polypyridine Compounds against Enteric Protozoan Parasite <i>Entamoeba histolytica</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 457 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsinfecdis.1c00418	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 Taku Izumi, Hirai Tomohiro, Makiuchi Takashi, Shinzawa Naoaki, Iwanaga Shiroh, Annoura Takeshi, Nagamune Kisaburo, Nozaki Tomoyoshi, Saito-Nakano Yumiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Rab5b-Associated Arf1 GTPase Regulates Export of N-Myristoylated Adenylate Kinase 2 From the Endoplasmic Reticulum in Plasmodium falciparum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 610200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.610200	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 Saito Nakano Yumiko, Wahyuni Ratna, Nakada Tsukui Kumiko, Tomii Kentaro, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Rab7D small GTPase is involved in phago , trogocytosis and cytoskeletal reorganization in the enteric protozoan Entamoeba histolytica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13267	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中野 由美子, 梅木 優子, 下川 周子, 小林 浩一, 橋本耕一, 高田恭臣, 牧井千波, 長谷部里衣, 吉田友里, 中島理子, 小林 正規, 久枝
2. 発表標題 婦人科におけるトリコモナスの無症候感染とメトロニダゾール感受性
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sanjib Kumar Sardar, Yumiko Saito-Nakano, Shanta Dutta, Tomoyoshi Nozaki, Sandipan Ganguly
2. 発表標題 Entamoeba moshkovskii; new upcoming Entamoeba infection in India
3. 学会等名 ICOPA (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野 由美子, 牧内 貴志, 柝倉 麻美, 津久井 久美子, Carol A. Gilchrist, William A. Petri Jr, 野崎 智義
2. 発表標題 赤痢アメーバにおける膜輸送の多様化とアメーバ性肝膿瘍形成に必要なトランスゴルジ輸送を制御するArfX2 GTPaseの役割
3. 学会等名 第92回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 多久 和泉, 平井 智浩, 牧内 貴志, 新澤 直明, 岩永 史朗, 案浦 健, 永宗 喜三郎, 野崎 智義, 中野 由美子
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫Rab5bの結合タンパク質はN-ミリスチル化adenylate kinase 2を小胞体から選別輸送する
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izumi Taku, Tomohiro Hirai, Takashi Makiuchi, Naoaki Shinzawa, Shiroh Iwanaga, Takeshi Annoura, Kisaburo Nagamune, Tomoyoshi Nozaki, Yumiko Saito-Nakano
2. 発表標題 Rab5b associated proteins regulate the transport of N-myristoylated AK2 from the endoplasmic reticulum in Plasmodium falciparum
3. 学会等名 Woods Hole Molecular Parasitology Meeting MPM XXXII (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多久 和泉, 平井 智浩, 新澤 直明, 岩永 史朗, 牧内 貴志, 永宗 喜三郎, 野崎 智義, 中野 由美子
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫N-アシル化Rab5bとArf1は小胞体近傍から寄生胞膜への輸送に関与する
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会・第19回日本蛋白質科学学会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多久 和泉, 平井 智浩, 新澤 直明, 岩永 史朗, 牧内 貴志, 永宗 喜三郎, 野崎 智義, 中野 由美子
2. 発表標題 熱帯熱マラリア原虫N-アシル化Rab5bとArf1, Ran1bの小胞体近傍における局在解析
3. 学会等名 第79回日本寄生虫学会東日本支部大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------