

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590432

研究課題名（和文）*Entamoeba* の嚢子形成及び脱嚢に必須な運動性調節機構の解析研究課題名（英文）Analysis of regulatory mechanism of motility essential for *Entamoeba* encystation and excystation

研究代表者

牧岡 朝夫 (MAKIOKA ASAO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90119850

研究成果の概要（和文）：アメーバの嚢子形成及び脱嚢はヒトへの感染型の形成及び感染の成立のための重要な過程である。本研究は両過程に必須なアクチン細胞骨格再編成の重要分子であるアクチン脱重合因子コフィリン並びにプロフィリンに注目し、アメーバゲノム中の両遺伝子の同定、塩基配列の決定、系統解析、組換えタンパク質の調製、局在及び両過程における発現解析を行い、分子種による違いを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The encystation and excystation of *Entamoeba* are important processes for formation of the infective form and establishment of the infection. The present study focused on an actin depolymerizing factor cofilin and profilin, which are essential for reorganization of actin cytoskeleton, and investigated their identification, gene cloning, phylogeny, preparation of recombinant proteins, localization and expression analysis and found different expression of each molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

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：*Entamoeba*、嚢子形成、脱嚢、コフィリン、プロフィリン、アクチン細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

アクチン細胞骨格は細胞の運動や増殖・分化等の形態変化にその動力として中心的に働く細胞骨格であり、細胞運動に関与している。アクチン線維は分子量約 4.2 万の球状タンパク質である G-アクチンが螺旋状に重合した F-アクチ

ンと呼ばれる構造体で、その形態や局在は機能に応じてダイナミックに変化する。このような形態変化、あるいは細胞内での重合・脱重合などの調節は、アクチンそのものの性質によるものではなく、様々なアクチン調節タンパク質に

よって制御されている。その内の一つコフィリン（分子量 19 kDa）は ADF/コフィリンファミリーに属し、アクチン脱重合・切断因子としてアクチン骨格の再編成の最重要因子である。酵母、線虫、ショウジョウバエにおけるその遺伝子の欠損は致死となる。運動中の細胞にみられる細胞仮足の先端は、アクチン線維のプラス（+）端の重合によって伸長するため、仮足の伸長につれて細胞質中の G-アクチンモノマーが消費され、伸長速度は次第に遅くなる。そこで、コフィリンはマイナス（-）端からの脱重合を加速してアクチン線維のリサイクルを促進し、効率的な運動を支えている。コフィリンは、この他にも細胞質分裂やエンドサイトーシス等の場で、アクチン線維系の急速な変化に関わっている。一方、アクチン結合タンパク質であるプロフィリンは ADP 結合アクチンユニットに結合して、ADP と ATP の交換を刺激することでコフィリンの効果を逆転させ、プロフィリンと結合した ATP 結合アクチンユニットはコフィリンと分離して自由に重合することができる。更に、プロフィリンはアクチン結合部位の他にプロリン結合部位及びホスホイノシチド結合部位をもつことから、多機能蛋白質として機能することが明らかになっている。

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*: Eh) のアクチン細胞骨格の機能に関しては、栄養型の運動、組織侵入、宿主細胞の貪食等の病原性への関与が明らかになっているが、in vitro での囊子形成系が確立されていないため、研究は栄養型に限られ、囊子形成及び脱囊に関するものは皆無である。囊子形成は大腸において栄養型がその運動性を失い、形態的に球形になり、囊子壁の形成を行い、4 核の成熟囊子を形成する過程である。一方、脱囊は囊子中で虫体が運動性を回復し、囊子壁に極小の穴を開け、そこか

ら脱出する過程であり、囊子形成とは逆の過程である。ダイナミックなアクチン細胞骨格の再編成が必須と考えられる。我々は先に、囊子形成及び脱囊へのアクチン細胞骨格再編成の関与をアクチン重合阻害剤ならびに重合促進・安定化剤を用いて初めて明らかにした。その中でアクチン重合阻害剤 cytochalasin D は囊子形成に対しては阻害効果を示すのに対し、脱囊に対しては、予想に反し、促進効果を示すという結果を得ている。

2. 研究の目的

本研究は *Entamoeba* の囊子形成及び脱囊に深く関わるアクチン細胞骨格に注目し、その再編成の重要因子と考えられるコフィリン及びプロフィリンの機能解析を RNAi を用いて行い、これらの調節タンパク質の生化学的・分子生物学的特性を組換えタンパク質を用いて解析する。さらに、アクチン及び調節タンパク質の両過程における動態を蛍光抗体法により明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

赤痢アメーバ (Eh) は無菌培養系での囊子形成が不可能なため、そのモデルとなる爬虫類寄生のアメーバ *Entamoeba invadens* (Ei) の in vitro の系を用いた。即ち、Ei 栄養型を囊子形成液に移し 3 日間培養することにより囊子を得、この囊子を栄養型培養液に戻すことにより脱囊を誘導した。ゲノムデータベースの検索、遺伝子のクローニング、塩基配列の決定、組換えタンパク質の調製は常法により行った。蛍光抗体法・共焦点レーザー顕微鏡により、局在を観察した。発現解析はリアルタイム RT-PCR を用いて行った。

4. 研究成果

(1) コフィリン (cofilin: Cfl) の解析

① 相同検索: Eh 及び Ei のゲノムデータベースを用いた相同検索の結果、Eh には 1 種、Ei に

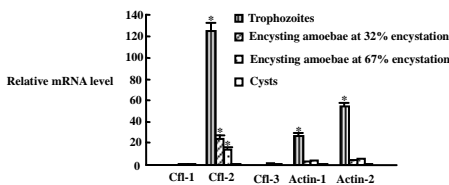
は3種Cf1(Cf1-1、Cf1-2、Cf1-3)の存在が明らかになった。同様に相同検索の結果、運動性の本体であるEiのアクチン(actin: Act)にはAct-1、Act-2の2種の存在も判明した。

②クローニング及び塩基配列の決定：Cf1及びAct遺伝子につき、PCRによる増幅、プラスミドへの導入を行い、その塩基配列を決定した。

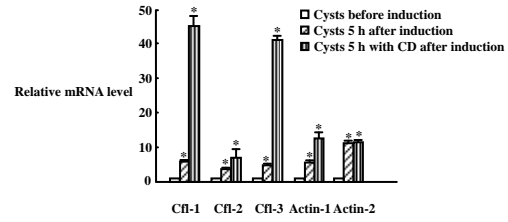
③系統解析：EntamoebaのCf1ならびに他の生物のCf1/ADFを用いて系統樹を作成し解析した結果、EntamoebaのCf1は他の生物のCf1/ADFとは離れた独立したクレイドを形成した。

④局在の解析：EiCf1-2及びActに対する抗体を用いた蛍光抗体法により局在を調べた結果、栄養型、嚢子、脱嚢したアメーバの細胞膜直下の領域が両者ともに染色され、同じ局在を示した。特に、栄養型及び脱嚢したアメーバの仮足の部分は両者ともに強く染色された。

⑤栄養型、嚢子のCf1及びActのmRNAレベル：栄養型ではCf1-2が圧倒的に発現され、Cf1-1とCf1-3はほとんど発現されておらず、Cf1-2も嚢子では極めて低いレベルになることが確認された。Actも栄養型での発現が極めて高く、Act-2がAct-1よりも発現が高かった。⑥嚢子形成に伴うmRNAレベル：嚢子形成の初期にCf1のmRNAレベルの急激な低下が認められ、嚢子になると更に低下した。アクチンについても同様であった。



⑦脱嚢誘導に伴うmRNAレベル：各Cf1の脱嚢誘導5時間後のmRNAレベルの亢進が確認され、cytochalasin D存在下でのCf1-1とCf1-3の著明な亢進も認められた。

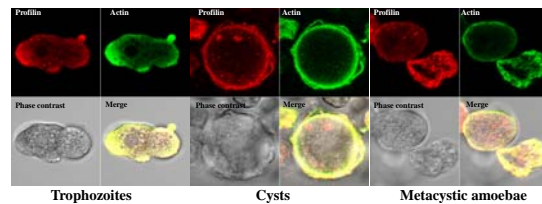


(2)プロフィリン(profilin: PFN)の解析

①相同検索：Eiのゲノムデータベースを用いて相同検索を行った結果、EiにはPFN1(132アミノ酸)、PFN2(129アミノ酸)、PFN3(130アミノ酸)、PFN4(131アミノ酸)の4種のPFNの存在が明らかになった。

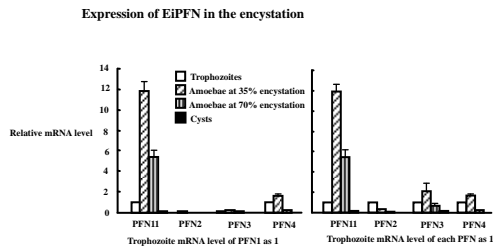
②クローニング・塩基配列の決定：4種PFNにつき、cDNAをテンプレートにしたPCRによる増幅、プラスミド(pQE31)への導入を行い、その塩基配列を決定した。

③局在の解析：EiPFN1及びアクチンに対する抗体を用いた蛍光抗体法により局在を調べた結果、栄養型、嚢子、脱嚢したアメーバのいずれも細胞膜直下の領域が両者ともに染色され、同じ局在を示した。特に、栄養型の仮足の部分は両者ともに強く染色され、アメーバの運動への関与が強く示唆された。

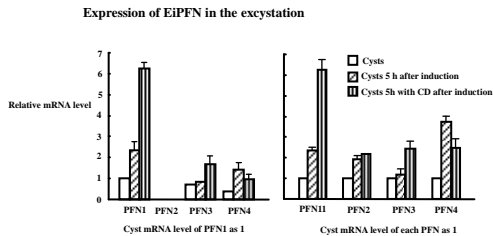


④栄養型、嚢子のPFNのmRNAレベル：栄養型ではPFN1とPFN4がPFN2とPFN3よりもより多く発現され、嚢子ではPFN1とPFN3がほぼ同じレベル、PFN4が続き、PFN2は極めて低いレベルであった。

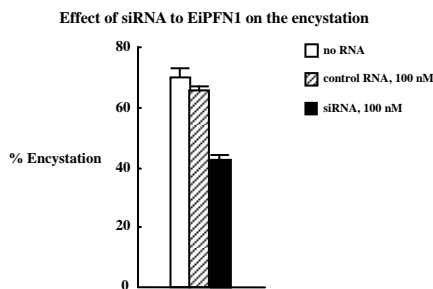
⑤嚢子形成に伴うmRNAレベル：嚢子形成初期にPFN2以外の3種PFNの発現の増加が認められ、後期には減少した。



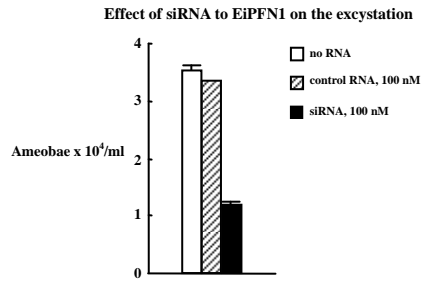
⑥脱嚢誘導に伴う mRNA レベル：脱嚢誘導によりすべての PFN の mRNA レベルの亢進が確認された。Cytochalasin D 存在下では EiPFN1 と EiPFN3 において亢進が認められ、特に EiPFN1 で顕著であった。一方、EiPFN4 では減少傾向が認められた。



⑦EiPFN1 に対する siRNA の増殖に対する効果：アメーバの増殖に対する効果を調べた結果、ほとんど影響が認められなかった。
 ⑧EiPFN1 に対する siRNA の嚢子形成に対する効果：嚢子形成に対して抑制効果が認められ、EiPFN1 の関与が明らかになった。



⑨EiPFN1 に対する siRNA の脱嚢に対する効果：脱嚢に対しても抑制効果が認められ、EiPFN1 の関与が明らかになった。



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 3 件)

- ① Makioka A, Kumagai M, Hiranuka K, Kobayashi S, Takeuchi T. *Entamoeba invadens*: identification of ADF/cofilin and their expression analysis in relation to encystation and excystation. *Exp Parasitol* 127: 195-201, 2011. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 牧岡朝夫: *Entamoeba* の脱嚢に伴うアクチン脱重合因子コフィリンの発現解析. 第 79 回日本寄生虫学会大会. 2010 年 5 月 21 日, 旭川.
- ② 牧岡朝夫: *Entamoeba* のアクチン脱重合因子コフィリンの解析. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009 年 12 月 11 日, 横浜.
- ③ 牧岡朝夫: *Entamoeba* の脱嚢におけるコフィリンの発現解析. 第 42 回日本原生動物学会大会. 2009 年 10 月 30 日, 石巻.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧岡 朝夫 (MAKIOKA ASAO)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90119850