

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16233

研究課題名(和文) 赤痢アメーバにおけるメンブレンコンタクトサイトの分子機構

研究課題名(英文) Unraveling the role of membrane contact sites in *Entamoeba histolytica*

研究代表者

サントス ハルベルト・ヒメネス (Santos, Herbert Jimenez)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：90793779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質複合体と相互作用するパートナーの質量分析シーケンスの分析が完了し、EHD1が赤痢アメーバのミトソームとエンドソームの接触部位を仲介することを示しています。食作用、エンドサイトーシス、およびリポソームベースのアッセイによる機能的特性評価も完了しました。この研究の結果を要約した研究記事は、2022年4月11日にmBioによって提出され、承認されました。研究の結果は、2つのレビュー記事の作成にも含まれていました(2022年1月27日に承認されたGenesとJournal of Eukaryotic Microbiologyが最初に公開されました。2022年5月19日)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜接触部位(MCS)は、細胞小器官間のコミュニケーションに重要な機構であり、さまざまな細胞小器官間でその存在が広く確認されている。寄生性原虫赤痢アメーバは、寄生や病原性の発揮に必要なミトソームと呼ばれるミトコンドリアが縮退進化したオルガネラを持つ。赤痢アメーバで新たに発見されたミトソーム-エンドソーム間MCSはETMP1とEHD1の相互作用により形成される。これは、赤痢アメーバに限らず、多様な生物の多様なオルガネラがMSCを形成し、オルガネラ間のクロストーク機構を保存している可能性を示唆している。また本研究により、病原機構の一端が明らかとなり、将来的に新規治療法を開発する一歩となった。

研究成果の概要(英文)：Analysis of mass spectrometry sequencing of protein complexes and interacting partners were completed, indicating EHD1 mediates mitosome to endosome contact site in *Entamoeba histolytica*. Functional characterization by means of phagocytosis, endocytosis, and liposome-based assay were also completed. A research article summarizing the results of this research was submitted and accepted by mBio on April 11, 2022. Results of the research were also included in making two review articles (Genes accepted on January 27, 2022 and the Journal of Eukaryotic Microbiology first published on May 19, 2022).

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：Entamoeba histolytica mitosome endosome membrane contact site EH-domain

1. 研究開始当初の背景

真核生物は、様々な膜によって区切られた、機能が異なるオルガネラを持つことが最大の特徴である。これらオルガネラは、細胞内膜輸送やオルガネラ相互作用によってお互いに情報交換を行っている(Nobel Prize Medicine 2013)。中でも、オルガネラ膜同士が接近し、直接相互作用する場所は membrane contact site (MCS) と呼ばれ、タンパク質・脂質・代謝物のオルガネラ間の輸送を行い、シグナルを伝達する重要な構造体である。近年、腸管寄生性原虫の赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) のエンドソームと mitochondrion-related organelle(MRO) との間に MCS が存在することを我々は新規に発見した。

MCS は 1950 年代に初めて電子顕微鏡によって観察されたが、その機能の理解には至らなかった。ER-ミトコンドリア間 MCS において、リン脂質の合成や輸送が行なわれていることが明らかになったことをきっかけに、この 20 年間で MCS に関する研究は躍進した。赤痢アメーバにおける MCS は、現在まで全く報告されていないが、申請者は独立した幾つかの実験において、MCS を何度も目にした。(a)マイトソームタンパク質 EHI_0993507 が免疫蛍光染色や電子顕微鏡観察、細胞分画法により ER にも局在することが判明した。これらの結果はこの分子が二つのオルガネラのテザリングを行っていることを示唆している。(b)免疫沈降実験により、マイトソームタンパク質 ETMP30 とゴルジ体タンパク質 SPCA、(c) マイトソームタンパク質 ETMP1 と、エンドソーム膜タンパク質 EHD1 が相互作用していることが明らかとなった。これはマイトソーム-ゴルジ体間 MCS、マイトソーム-エンドソーム間 MCS の存在を示唆している。これらの観察結果から、赤痢アメーバのマイトソームに関連する MCS に注目した。これは、赤痢アメーバにおけるマイトソームの新しい機能の解明につながる新たな側面であり、ER、ゴルジ体、エンドソーム、ミトコンドリアに關与するオルガネラクロストークの新規知見を得ることも期待される。

MCS の研究は国内外で盛んに行なわれている。オルガネラ間の相互作用は、コンタクトサイトやその他の相互作用タンパク質によって促進される。理由のひとつとして、医学的観点からも MCS が注目されていることがある。脂質転移タンパク質である Vps13A は、ハンチントン病の、Vps13C は、パーキンソン病の原因遺伝子である。近年、脂質転移タンパク質と相互作用する MCS が抗がん剤や抗ウイルス剤の標的として注目されている。また、オルガネラゾーンと呼ばれるオルガネラの中の異なる役割を担う場が MCS 形成により様々な機能を促進していることから、この研究は細胞生物学の分野でも注目を集めている。しかし、寄生虫における MCS についてはまだ不明な点ばかりである。赤痢アメーバの MCS に関する我々の知見もまだ多くはない。MCS 形成に關与する分子、MCS の細胞内での役割に関しては更なる研究が必要な点である。

2. 研究の目的

本研究は、赤痢アメーバにおける MCS の機能と、それに關与する分子の同定を目的としている。赤痢アメーバ MCS の知見を得ることにより、赤痢アメーバのみならず、現在まで MCS の報告がなかった近縁の嫌気性腸管寄生性生物における MCS 研究の促進が予想できる。さらに、真核生物における MCS の普遍性や多様性の解明にも寄与すると考えられる。

赤痢アメーバにおける小胞輸送を介したオルガネラ相互作用は我々の研究室で盛んに行われており、カーゴ選択や輸送に關与する分子や、RabGTPase や ESCRT が關与するエンドソームのダイナミクスなどが徐々に明らかになってきている。しかし、エンドソームと他のオルガネラの間 MCS に関しては今まで報告がない。そのため、本研究は赤痢アメーバのオルガネラ間の相互作用における新規発見と研究の発展を引き起こすことが期待される。さらに、MCS の普遍性という側面でも他種生物に対しても新規知見を与えると同時に、MCS の多様性、特に嫌気性生物間での多様性を示すことになると考えられる。

3. 研究の方法

2020 年: 赤痢アメーバ MCS の構成因子の同定

マイトソーム-エンドソーム間 MCS 構成因子の同定

すでに MCS への關与が示されている ETMP30、EhSPCA、ETMP1、EHD1 を足がかりに、これらタンパク質と結合し、MCS の形成に關与するタンパク質を免疫沈降法 (IP)、Blue Native-PAGEによる複合体形成分離¹² と酵素触媒近接

依存性ビオチン化標識法 (BioID)¹³ と質量分析によるタンパク質同定により明らかにする。BioIDを使った実験は、マイトソームをもつ関連嫌気原生生物 *Giardia intestinalis* において既に実施されている。同定された MCS 相互作用タンパク質候補を赤痢アメーバ内で発現させ、間接免疫蛍光法¹⁴ と免疫電験¹⁵、Live imaging、細胞分画法¹⁴、FRET 解析により候補タンパク質の局在、他のタンパク質との相互作用を確認する。電子顕微鏡や FRET解析 を利用して、オルガネラ同士のコンタクトや接近を観察する。

2021 年: MCS 構成因子の機能解析

マイトソーム-エンドソーム間 MCS の機能解析

MCS 構成タンパク質それぞれの遺伝子発現抑制株を作成し、マイクロアレイや RNAseq を用いて、赤痢アメーバの生存における必須性を検証する。MCS 構成タンパク質の重要なドメインまたはモチーフに変異を挿入し、テトラサイクリン誘導プロモーター支配下で発現誘導が可能な形質転換株を作成し、これらの変異体の発現の増殖・代謝 (特にマイトソームで重要な代謝である硫酸活性化経路)・膜輸送系 (エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、ファゴサイトーシス、トロゴサイトーシス) への影響を検証する。MCS の形成に関与するマイトソームとエンドソームの脂質解析を行い、オルガネラ接触・MCS 形成による脂質の輸送などが、上記 MCS 構成タンパク質の遺伝子発現抑制株や変異体導入株において影響を受けるかどうかを検証する。特に、リポソームを使ったリン脂質や Ca^{2+} の輸送解析、オルガネラ特異的ケージド脂質メッセンジャー^{16,17} を利用した脂質の輸送解析を行う。

4. 研究成果

インシリコ分析から、EHI_175060 を系統特異的なマイトソーム膜タンパク質として同定しました。HA-ETMP1 を発現させ、免疫蛍光アッセイ、密度勾配分画、細胞内分画とそれに続く炭酸塩処理、および免疫電子顕微鏡法。ETMP1 は不可欠であり、その過剰発現は劇的な成長障害を引き起こします。低分子 RNA 転写干渉によって etmp1 遺伝子をサイレンシングする試みを何度か試みましたが、形質転換体が薬剤選択に耐えられなかったため、すべて失敗しました。これは、寄生虫に対するその必須性を示唆しています。ETMP1 は EH ドメインを含むタンパク質と相互作用します。免疫沈降 (IP) は、HA-ETMP1 発現株とモックコントロール株のオルガネラリッチ画分からの抗 HA アガロースビーズによって、HA-ETMP1 発現株とモック細胞のオルガネラリッチ画分を使用して実行されました。次に、質量分析によるタンパク質シーケンシング分析と、それに続く定量値 (QV) の差分比較を行い、HA-ETMP1 とモック HA コントロール間の重み付けされていないスペクトルカウントで正規化して、ETMP1 の相互作用パートナーを特定しました。同定されたものの中には、マイトソームタンパク質 L-ミオイノシトール-1-リン酸シターゼ (EHI_070720) タンパク質 1 を含む EH ドメイン (EHD χ EHI_105270) およびその類似体である EHD α (EHI_152680) がありました。ブルーネイティブ (BN) -PAGE 分析により、ETMP1 がそれぞれ約 90kDa と 180kDa のタンパク質複合体の一部であることが確認されました。これら 2 つの複合体を含む切除された銀染色 BN-PAGE バンドのタンパク質シーケンシング分析により、90kDa と 180kDa の複合体バンドの両方に EHD1 とその類似体 EHD3 (97% 同一) を含む多数のタンパク質が同定されました。したがって、EHD1 を ETMP1 の潜在的な相互作用パートナーの 1 つと見なしました。HA-EHD1 のシグナルの大部分は小胞に現れるため、次に、抗 HA 抗体と次の抗血清のいずれかをそれぞれ使用して IFA を共染色することにより、HA-EHD1 でマークされた小胞の特性を調べました。抗ピリジンヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ (PNT) および抗 Rab11B。抗 Vps26 のピアソン相関 R 値の範囲が 0.22~0.37、-0.16~抗 PNT の場合は 0.19、抗 Rab11B の場合はそれぞれ -0.12~0.01。Vps26 はレトロマー複合体成分であり、赤痢アメーバのエンドソーム/ファゴソームのマーカーです。PNT は、リソソームやファゴソームを含む多数の小胞/液胞の膜に局在しますが、Rab11B は後期エンドソームと部分的に共局在することが示されました。総合すると、これらのデータは、EHD1 が主にエンドソーム膜に局在していることを示唆しています。エンドソーム膜には Vps26 とある程度の PNT が含まれている可能性があります。Rab11B は含まれていません。HA-EHD1 はオルガネラ膜と弱く結合しており、PI (3,5) P2 および PI (4,5) P2 に優先的に結合します。HA-EHD1 発現株のオルガネラ濃縮画分と同様の炭酸塩分画アッセイを実施しました。抗 HA 免疫プロットに基づいて、HA-EHD1 は細胞小器官画分にのみ含まれていました。また、オルガネラ濃縮画分の炭酸塩処理による HA-EHD1 の膜統合を評価しました。イムノプロットの結果は、HA-EHD1 がリソソーム膜タンパク質マーカー CPBF1 と比較して膜結合していないことを示しました。代わりに、プロファイルは、末梢小胞体膜タンパク質である Sec13 を標的とする抗血

清で免疫染色されたプロットのプロファイルと類似しています。これは、HA-EHD1 がオルガネラ膜に統合されておらず、オルガネラ膜に弱く関連していることを示唆しています。EHD1 のリン脂質結合能力を検証および特性評価するために、HA-EHD1 および HA-SNX1 (PI3P 結合タンパク質コントロール) のライセートをそれぞれ使用して脂質オーバーレイアッセイを実行しました。結果は、HA-EHD1 がホスホイノシチド二リン酸、特に PI (3,5) P2 および PI (4,5) P2 に優先的に結合することを示しました。

HA-EHD1 の過剰発現は、多小胞体 (MVB) 形成の増強を示しました。また、テトラサイクリン (tet) 誘導の制御下で HA-EHD1 を発現させました。HA-EHD1 の IFA 分析は、タンパク質が同様に、それぞれ 1 時間および 3 時間の tet 誘導発現後にさまざまな小胞の膜に局在することを示しました。ただし、tet による誘導の 24 時間後に、局在化と、トロフォゾイトを発現する細胞内小胞パターン全体の劇的な変化に気づきました。ここでは、抗 HA シグナルでもマークされた大きな多小胞体 (MVB) が観察されました。この表現型は、複数の共焦点面の 1 つから測定したときに、直径が 5 μm から最大 14 μm の MVB を示した発現細胞の 32.4% ($n = 105$) で示されました。これらの発見は、免疫電子顕微鏡写真によっても裏付けられ、HA-EHD1 の tet 誘導発現の 24 時間後、陥入した小胞の首を含む MVB の膜に沿った金抗 HA 粒子の免疫装飾を示しています。これらのデータは、赤痢アメーバの MVB の生合成における EHD1 の関与を示しています。

最後に、組換え His-EHD1 が *in vitro* で機能的な ATPase 活性を持っていることを示しました。バクテリアでアミノ末端ヒスチジン (His) タグ付き *E. histolytica* EHD1 を発現させ、ニックル-ニトリロ酢酸 (Ni-NTA) -アガロースビーズを使用して His-EHD1 を精製しました。精製された His-EHD1 は、ミカエリスメンテン定数 (K_m) 値 $94.91 \pm 16.63 \mu\text{M}$ および最大速度 (V_{max}) $9.85 \pm 0.37 \mu\text{mole} / \text{min}/\text{mg}$ で ATPase 活性を示しました。

赤痢アメーバのマイトソームとエンドソームの間の新しい膜接触部位を報告します。この前例のない MCS は、ミトソーム膜タンパク質 ETMP1 と C 末端 EH ドメイン含有タンパク質 EHD1 を特徴としています。ETMP1 はエントアメーバに特有のタンパク質であり、寄生虫の増殖に不可欠です。これは、*E. histolytica* のさまざまなエンドサイトーシスプロセス、すなわち、哺乳類細胞のバルクおよび受容体を介したエンドサイトーシス、食作用および齧作用中の初期エンドソーム形成、および多小胞体の生成のための管腔内小胞の陥入に関与するタンパク質である EHD1 と相互作用します。このような新しい ETMP1-EHD1 相互作用は、他の生物で実証されているさまざまな生理学的プロセスにおけるこのマイトソーム-エンドソーム MCS の役割の可能性を示唆しています。したがって、ETMP1-EHD1 を介した接触部位は、脂質の移動、生合成、オートファジー、細胞小器官のダイナミクス、および MRO の品質管理に関与していることを提案します。この MCS および他の MRO 関連 MCS の分子メカニズムと機能を完全に分析するには、さらなる調査が必要です。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Herbert J. Santos, Tomoyoshi Nozaki	4. 巻 83
2. 論文標題 Interorganellar communication and membrane contact sites in protozoan parasites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2021.102372	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 Ruofan Peng, Herbert J Santos, Tomoyoshi Nozaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Transfer RNA-Derived Small RNAs in the Pathogenesis of Parasitic Protozoa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes13020286	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 Herbert J Santos, Yuki Hanadate, Kenichiro Imai, Haruo Watanabe, Tomoyoshi Nozaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Entamoeba histolytica EHD1 Is Involved in Mitosome-Endosome Contact.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.03849-21	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Herbert J. Santos, Tomoyoshi Nozaki	4. 巻 -
2. 論文標題 The mitosome of the anaerobic parasitic protist Entamoeba histolytica: a peculiar and minimalist mitochondrion-related organelle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Eukaryotic Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jeu.12923	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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Herbert J. Santos, Yuki Hanadate, Kenichiro Imai, Tomoyoshi Nozaki
2. 発表標題 Entamoeba histolytica EHD1 is involved in mitosome-endosome contact
3. 学会等名 90th Annual Meeting of the Japanese Society of Parasitology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Herbert J. Santos, Yuki Hanadate, Kenichiro Imai, Tomoyoshi Nozaki
2. 発表標題 EH-domain containing protein 1 is involved in mitosome-endosome membrane contact site in the protozoan parasite Entamoeba histolytica
3. 学会等名 73rd Annual Japanese Society for Cell Biology Virtual Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Herbert J. Santos, Takashi Makiuchi, Tomoyoshi ozaki
2. 発表標題 A possible role of exosomal hydrolase receptors in the pathogenesis of the human intestinal parasite Entamoeba histolytica
3. 学会等名 Extracellular Vesicle Studies: From Benchtop to Therapeutics. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Virtual Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Herbert J. Santos, Takashi Makiuchi, Tomoyoshi ozaki
2. 発表標題 A possible role of exosomal hydrolase receptors in the pathogenesis of the human intestinal parasite Entamoeba histolytica
3. 学会等名 American Society for Cell Biology (ASCB)/European Molecular Biology Organization(EMBO) Virtual Conference (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------