

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 5 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590514

研究課題名(和文) 赤痢アメーバの貪食特異性を制御する因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of factors involvement of specificity of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*

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・その他部局等・研究員

研究者番号：30321764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：腸管内寄生原虫赤痢アメーバの貪食特異性を解析するために、細胞内の分子スイッチRab8細胞内局在を検討した結果、Rab8はBiPと最も高い共局在を示し、小胞体に局在することが分かった。また、ER exit siteマーカーのSec13とは局在が一致せず、COPII小胞には組み込まれないことが示唆された。よって、Rab8が細胞外に輸送する細胞表面レセプターは、COPIIを介していないことが予測された。

研究成果の概要(英文)：Phagocytosis is indispensable for the pathogenesis of the intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. This report showed that in *E. histolytica* Rab8A, which is generally involved in trafficking from the trans-Golgi network to the plasma membrane in other organisms, but was previously identified in phagosomes of the amoeba in the proteomic analysis, primarily resides in the endoplasmic reticulum (ER) and participates in phagocytosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分子 Rab GTPase 貪食 小胞体

## 1. 研究開始当初の背景

赤痢アメーバが宿主細胞や細菌を貪食する際には、異なる細胞表面レセプターが貪食の対象を認識している。特に、細胞表面の Gal/GalNac レクチンが貪食の対象を認識するのに重要であり、Gal/GalNac レクチンは赤痢アメーバの病原性を考える上で、重要な表面レセプターである。近年の赤痢アメーバのゲノム情報の公開により、赤痢アメーバには TMK ファミリーと総称される Gal/GalNac レクチンに相同性を示す膜タンパク質が 80 種類以上も存在することが明らかとなった。さらに、TMK ファミリーの幾つかのサブファミリーは、赤血球や細菌など、対象物の認識に関与していることが報告されている。しかし、赤痢アメーバ表面には他にも多くの細胞表面タンパク質が提示されており、その機能や細胞外への提示機構は明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

申請者は真核生物に保存された細胞内輸送経路のスイッチタンパク質 Rab GTPase の解析を行い、赤痢アメーバなど貪食能を有する原虫には、細胞内輸送関連遺伝子が多様化していることを報告してきた。また、Rab GTPase の局在や機能も、マクロファージとは異なっていた。このことは、赤痢アメーバの細胞内輸送が、貪食能の獲得とともに、特殊化してきたことを示唆している。貪食の特殊性を解析するために、赤痢アメーバのファゴソームのプロテオーム解析で Rab8 のホモログが同定されていた。Rab8 の貪食における役割を解析するために、Rab8 の発現抑制株を作成したところ、貪食効率が低下することが分かった。よって、Rab8 には、対象物の認識に必要な細胞レセプターの輸送に関与していることが示唆された。本研究では、Rab8 の細胞内局在を解析すると共に、細胞表面レセプターの輸送メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

Rab8 の細胞内局在を解析するために、TGN マーカーの Rab11B、エンドソーム系に局在する Vps26 との共局在をそれぞれの特異的な抗体を用いて観察した。また小胞体マーカーとして、小胞体内腔シャペロンの Hsp70 である Bip (EHI\_199890)、小胞体からの COPII 小胞の出芽に必要なコートタンパク質 Sec13 (EHI\_001050) の抗体を作成した。BiP は C 末端ドメインに相当する 433-661 残基を、Sec13 は全長の大腸菌の組換えタンパク質を作成した。また、ゴルジ体マーカーとしてシスゴルジに局在する繫留因子 SNARE である Sed5 (EHI\_148750) と糖鎖合成酵素ガラクトシルトランスフェラーゼ GalT1 (EHI\_000660)

の GFP 融合遺伝子を作製し、赤痢アメーバで初めて小胞体とゴルジ体の可視化を行った。

## 4. 研究成果

今回作成した抗 Bip 抗体で染色した赤痢アメーバの小胞体は、ER 内腔に局在する組換えタンパク質(シグナルペプチド GFP-KDEL) と間接蛍光顕微鏡観察ではシグナルが完全に共局在した。その染色像は、以前、赤痢アメーバの ER として報告されていた細胞全体に広がるネットワーク状の構造を示した。また、Sec13 の局在は、薄い細胞質の局在と、強いドット状の局在像を示した。この強いドット状のシグナルは、調節可能なテトラサイクリンのプロモーター下流で一過的に発現させた積み荷タンパク質(システインプロテアーゼ 5-HA) の染色像と一致し、このドットが ER からの COPII 小胞の出芽部位(ER exit site) であると考えられた。

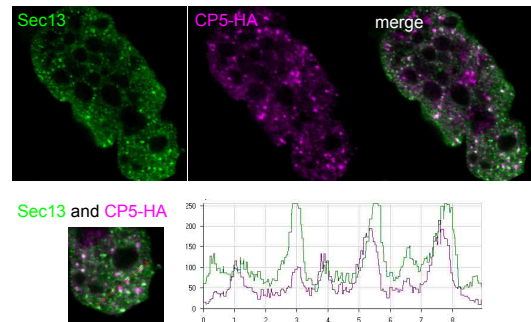


図1、赤痢アメーバの COPII 小胞出芽部位 (ER exit site) の可視化。調節可能なテトラサイクリンプロモーター下流で2時間発現誘導させた積み荷タンパク質と共局在するドット状の構造が観察された。

GalT1-GFP の染色像は、BiP で染色されるネットワーク構造の表面の特異的部分にドット状に近接していた。このことは、赤痢アメーバの ER が発達しておらず、小さなオルガネラであることを示す。実際に、赤痢アメーバには、ゴルジ体に局在する糖タンパク質合成遺伝子酵素群が欠質している他、ゴルジ体層間輸送に関与する Rab6 や GRASP などのホモログ遺伝子が欠質している。

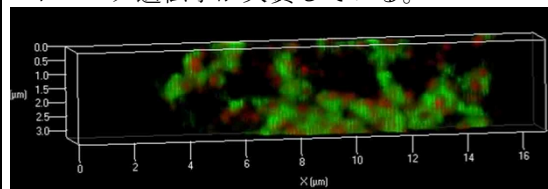


図2、抗 BiP 抗体で染色した ER (緑) と GalT1 で可視化したゴルジ体 (赤)。ネットワーク状の ER の周辺にドット状の GalT1 のシグナルが局在していた。

赤痢アメーバのシスゴルジ SNARE ホモログである Sed5 は、ヒトと酵母の Sed5 ホモログと 28%ならびに 24%の相同性を示し、赤痢アメーバにコードされる 25 個の Syntaxin の中で最も高い相同性を示した。間接蛍光観察での赤痢アメーバの Sec5 は GalT とは異なる膜に局在していることを示し、赤痢アメーバのゴルジ体は、他種生物と特殊化していることを示唆していた。

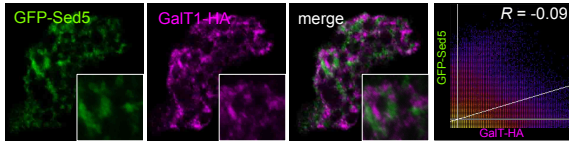


図 3、シスゴルジマーカー Sed5 ホモログと GalT1 を共発現させた株の二重染色像。両者のシグナルは共局在していない。

赤痢アメーバ Rab8 の細胞内局在は細胞全体に広がる膜構造であり、TGN やエンドソームに局在する Rab11B や Vps26 とは局在は一致しなかった。Rab8 は BiP と最も高い共局在を示し、広く小胞体に局在すると考えられた。また、ER exit site マーカーの Sec13 とは局在が一致せず、COPII 小胞には組み込まれないことが示唆された。よって、Rab8 が細胞外に輸送する細胞表面レセプターは、COPII を介していないことが予測できる。Rab8 を介する輸送が小胞体からの小胞を介していないなら、今後、Rab8 の機能を欠損した変異株が、小胞体ーゴルジ体間の輸送を介するシステインプロテアーゼの輸送には影響を与えないことを確認する必要があるだろう。興味深いことに、ヒトの Rab8 と Rab10 はアミノ酸で 66%の同一性を示し、同一の Rab8 サブファミリーに属している。ヒト Rab8 は TGN から形質膜への輸送を制御するのに対し、Rab10 は小胞体の脂質形成のサブドメインに局在していることが報告されている。おそらく、赤痢アメーバの Rab8 も小胞体上の脂質形成サブドメインに局在し、脂質代謝の異常がメンブレンラフトに局在する細胞表面レセプターの輸送に影響を与えたと推測している。

#### 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)

Merlyn Emmanuel, Yumiko Saito-Nakano, Tomoyoshi Nozaki, Sunando Datta. Small GTPase Rab21 Mediates Fibronectin Induced Actin Reorganization in *Entamoeba histolytica*: Implications in Pathogen Invasion (2015) *PLoS Pathogen*. 11(3): e1004666. 査読有

Young Ah Lee, Yumiko Saito-Nakano, Kyeong Ah Kim, Arim Min, Tomoyoshi Nozaki, Myeong Heon Shin. Modulation of endogenous Cysteine Protease Inhibitor (ICP) 1 expression in *Entamoeba histolytica* affects amoebic adhesion to Extracellular Matrix proteins. (2015) *Experimental Parasitology*. 149:7-15. 査読有

Mintu Chandra, Madhumita Mukherjee, Vijay Srivastava, Yumiko Saito-Nakano, Tomoyoshi Nozaki, Sunando Datta. (2014) Insights into GTP/GDP cycle of RabX3, a novel GTPase from *Entamoeba histolytica* with tandem G-domains. *Biochemistry*. 53(7):1191-205. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

花館有希、津久井久美子、野崎智義、中野由美子 (2015) 腸管寄生性原虫赤痢アメーバの食食を制御する小胞体に局在する Rab8A GTPase. 第 84 回日本寄生虫学会大会. 2015 年 3 月 21-22 日. 東京.

中野由美子、Mintu Chandra, 中曾根英子、川野哲郎、平井智浩、花館有希、Sunando Datta, 野崎智義 (2015) *Entamoeba* 属に保存したタンデム GTPase ドメインを有する RabX3 の機能解析. 第 84 回日本寄生虫学会大会. 2015 年 3 月 21-22 日. 東京.

Yuki Hanadate, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki, and Yumiko Saito-Nakano (2014) The ER-resident Rab8A GTPase is involved in the trafficking of surface proteins necessary for phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 2014 ASCB meeting. December 6-10. Philadelphia, Pennsylvania.

花館有希、津久井久美子、野崎智義、中野由美子 (2014) Rab8A が制御する寄生性原虫赤痢アメーバの食食機構の解明. 83 回日本寄生虫学会大会. 2014 年 3 月 26-28. 松山

Yuki Hanadate, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki, and Yumiko Saito-Nakano (2013) Regulation of phagocytosis by Rab8A in *Entamoeba histolytica*. 第 86 回日本生化学会大会. 2013 年 9 月 11 日-13 日. 横浜

Yumiko Saito-Nakano, Mami Okada, Yuki Hanadate, Carol A. Gilchrist, Oswald Crasta, William A. Petri, Jr., Zhangjun Fei, Nino Trapaidze, Tomoyoshi Nozaki. ROLE OF ARF GTPase AND TRAFFIC TO LYSOSOME IN *Entamoeba histolytica* PATHOGENESIS. XXVII Seminar on Amoebiasis, Merida, Mexico. 2013年2月28日-3月4日.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

<http://www.niid.go.jp/niid/ja/from-para.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中野 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