

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293093

研究課題名(和文)赤痢アメーバのプロテアーゼ分泌の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms of protease secretion in *Entamoeba histolytica*

研究代表者

野崎 智義 (Nozaki, Tomoyoshi)

国立感染症研究所・寄生動物部・部長

研究者番号：60198588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸管寄生性原虫赤痢アメーバのもつ、組織破壊に重要なシステインプロテアーゼの細胞内輸送・分泌の分子機構を解明することを目的に、リソソームから細胞膜への輸送に関与する低分子量GTPase Rab11Bと相互作用し活性を制御したり、分泌を直接実行する分子の特定を行った。活性型 Rab11B に特異的に結合するタンパク質としてbeta adaptin, gamma adaptin, Sec6を同定した。Rab11B が積み荷輸送において出芽から繫留まで制御することを示唆している。本研究成果は、病原因子の分泌と組織破壊を阻害する方法の構築にも役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* relies on Rab11B small GTPase-mediated vesicular traffic for its pathogenesis, more specifically secretion of cysteine proteases. We attempted to identify proteins that bind and regulate or are regulated by Rab11B. Three proteins, beta adaptin, gamma adaptin, and Sec6, among others, were identified as Rab11B binding proteins. These data indicate that Rab11B are involved in the processes encompassing vesicular budding through plasma membrane tethering. Our results helps in theory to formulate methods to prevent cysteine protease secretion and resulting tissue destruction by the amebae.

研究分野：感染症、原虫、病原機構、膜輸送、代謝、創薬、オルガネラ、進化

キーワード：感染症 原虫 病原機構 膜輸送 代謝 創薬 オルガネラ 進化

1. 研究開始当初の背景

寄生性原虫の病原機構の解析は、病原・寄生因子とこれら因子の遺伝子発現・活性化・輸送の制御の両面から解明されなくてはならない。病原機構に係る因子の原虫内での細胞内輸送に関しては、上記原虫を中心に Rab に制御された膜輸送機構が解明されつつある。またマラリア原虫では、寄生赤血球表面やマウレル裂へのタンパク質の輸送機構・シグナルなどの解析が進んでいる。我々は、赤痢アメーバがヒト大腸組織を傷害する分子機構を解析する中で、病原因子の活性化と輸送の制御が病原性の調節に重要な役割を果たすことを示してきた。細胞外に分泌されて病原性を担うプロテアーゼ等分子の細胞内輸送・分泌機構の詳細な分子機構を解明した例は、我々の赤痢アメーバを用いた一連の研究以外に存在せず、本原虫の小胞輸送の複雑さと相まって、寄生適応・進化における病原性と小胞輸送の共進化を解明する優れた研究対象となっている。言うまでもなく小胞輸送は真核生物の高次機構の維持に不可欠なユビキタな細胞機構である。

我々は赤痢アメーバの病原機構、特に小胞輸送を介した病原性因子の輸送の分子基盤の解明に関して、特に主要な組織侵入・融解因子であるシステインプロテアーゼ (CP) の輸送制御機構を多方面から同定・解明してきた。第1に、CPの細胞内オルガネラ間 (e.g., ゴルジ体-リソソーム) 輸送の方向性と特異性を決定する Rab small GTPase (以下 Rab) (Rab5, 7, 11) と Rab7A の下流の実行因子 (レトロマー複合体) の機能の解明した。更に、CP のリソソーム輸送を直接に調節する受容・輸送体 (CPBF1, CP binding family protein 1) 及びそのファミリータンパク質の機能を解明した。

100 以上存在する Rab のうち、CP などの病原因子の輸送に関与する Rab を過剰発現と発現抑制によりスクリーニングした結果、Rab11B の過剰発現により細胞外への CP の分泌が 6-10 倍上昇すること、これにより哺乳動物細胞の破壊が同様に増強されることが明らかになった (Mittra Cell Microbiol 2007)。したがって、Rab11B は他種生物で想定されている小胞体-ゴルジ体-リソソーム-細胞膜-細胞外という分泌経路で恐らくリソソーム以降の輸送過程の中心的な調節因子であると予想される。一方他種生物では Rab11 は一般に細胞表面からの受容体の回収などに関与し、主としてリサイクリングエンドソームに局在することが示されている。以上より、Rab11 は真核生物にユビキタスに保存しているが、赤痢アメーバの中で高度に機能分化している。そこで赤痢アメーバ Rab11B の制御する輸送経路を特定し、上流・下流の調節因子・機構を同定・解明し、本寄生性原生生物での Rab11 の特殊進化の有様を詳細に明らかにすることにより、Rab 進化の多様性と寄生性生物における Rab の高度進化の意義を理

解することを目指した。

2. 研究の目的

赤痢アメーバの Rab11B による CP (=病原因子) の分泌調節機構を解明するために、

1. Rab11B 結合分子 [=輸送先 (細胞膜) 上および細胞質内の下流シグナルの実行分子 (エフェクター) 群] を同定する

2. CP 分泌における Rab11B とエフェクタータンパク質の役割を解明する

以上の成果により、寄生原生生物における Rab 依存的 CP 輸送システムの特殊進化を詳細に解明するとともに、” Rab 依存的な小胞輸送の進化 ” の多様性の理解に資する研究成果とする。

3. 研究の方法

1. Rab11B の結合タンパク質 = エフェクター分子の同定

Rab11B の下流にあり、Rab11B が CP を輸送する標的オルガネラ (細胞膜・周辺小胞) や細胞内因子 (細胞骨格・アダプター等小胞形成因子など) 上で Rab11B と直接会合し、更に下流に、分泌に必要な細胞骨格の再編成などのシグナルを伝達することが予想されるタンパク質を特定することを目的として、GST 融合した Rab11B を大腸菌組換えタンパク質として合成し、赤痢アメーバの抽出液と混和、グルタチオンカラムにより Rab11B 結合タンパク質を濃縮・精製・分離する。結合時に GTP, GDP, 或いは EDTA 存在下で反応させることにより、Rab11B 活性化型 (GTP 結合型) と非活性化型 (GDP 結合型) に特異的に結合するエフェクター分子が分離・同定されることが期待される。更に、HA 標識をした Rab11B を発現した赤痢アメーバ形質転換体から直接 Rab11B と結合するタンパク質を免疫沈降法により獲得する予定である。この場合にも GTP, GDP への依存性に従い結合タンパク質の分離・精製を行う。

2. Rab11B 結合分子の機能解析

上記で同定されたタンパク質に関して、蛍光タンパク質 (GFP)、HA、halo 標識した Rab11B エフェクター発現体を作成する。代替法として Venus, mRFP, Kaede, AcGFP, mOrange を考慮する。

作成された Rab11B エフェクタータンパク質発現体を用いて CP 輸送の際の細胞膜への繫留 (テザリング tethering) に係るタンパク質 (具体的には上記の準備実験によって同定されたエクソシスト (exocyst) 複合体の複数因子を想定している) や Rab11B 結合ドメインや複合体の各因子間の結合ドメインを同定する。結合は、タンパク質内ドメインを欠損させた変異体を赤痢アメーバ内に発現させ免疫沈降法により、Rab11B への結合と複合体への取り込みなどを評価する。更に、Rab11B エフェクタータンパク質を発現抑制した赤痢アメーバ形質転換株を gene silence 法で作成し、CP 分泌に対する影響を検証する。

4. 研究成果

本研究は、腸管寄生性原生生物である赤痢アメーバを対象に、ヒト組織への侵入・破壊に中心的な役割を果たすシステインプロテアーゼの細胞内輸送・分泌の分子機構を生化学的・細胞生物学的・遺伝学的手法をもって解明することを目的とし、リソソームから細胞膜への輸送に関与する低分子量GTP分解酵素Rab11Bとその活性の制御、及び下流で分泌を直接実行する分子の特定・解析を成果目標とした。

活性型 Rab11B に特異的に、しかも GDP と比較して GTPγS 選択的に結合した Rab11B 結合タンパク質として、10 あまりのタンパク質が同定された。本研究では、検出ペプチド数が多く、GTPγS 特異性が高い候補として b-adaptin, g-adaptin, Sec6 を解析対象とした。

Adaptin はヘテロ四量体の Adaptor protein (AP) を構成して、輸送小胞の形成を促すコートタンパク質のリクルートを担う。赤痢アメーバは 25 種類の adaptin をもつが、うち 2 種類の b-adaptin, g-adaptin のみが活性型 Rab11B に不活性型より 10-13 倍高いアフィニティを示した。Sec6 は活性型 Rab11B に不活性型より 5.5 倍高いアフィニティを示した。Sec6 はヘテロ八量体の Exocyst を形成し、これは輸送小胞の細胞膜への繫留を担う。赤痢アメーバは Sec10 を 2 種類もつ一方で Exo84 を持たないことから、その形態・結合様式が他種生物とは異なることが示唆された。更に、局在解析と共免疫沈降法によって、3 つの候補タンパク質が膜画分で Rab11B と部分的に共局在することを示した。現在更に b-adaptin における Rab11B 結合部位を同定することを目的に、b-adaptin を Trunk, Hinge, Ear の 3 部位に分け、小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて組換えタンパク質の発現と Rab11B との相互作用を担う部位の特定を試みている。以上の結果は Rab11B が CP 輸送において出芽から繫留まで制御することを示唆している。本研究成果は、病原因子の分泌と組織侵入・破壊を阻害する方法論の構築にも役立ち、新たなワクチンや創薬の標的を提供する可能性がある。

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 13 件)

1. Chandra, M., Mukherjee, M., Srivastava, V. K., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T., Datta, S. Insights into GTP/GDP cycle of RabX3, a novel GTPase from *Entamoeba histolytica* with tandem G-domains. *Biochemistry* 53, 1191-1205, 2014. doi: 10.1021/bi401428f.
2. Marumo, K., Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., and Nozaki, T. Ligand heterogeneity of

the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Parasitol.* 44, 625-35 2014. doi: 10.1016/j.ijpara.2014.04.008.

3. Lee, Y. A., Saito-Nakano, Y., Kim, K. A., Min, A., Nozaki, T., Shin, M. H. Modulation of endogenous cysteine protease inhibitor (ICP) 1 expression in *Entamoeba histolytica* affects amoebic adhesion to extracellular matrix proteins. *Exp Parasitol.* 149C:7-15, 2014. doi: 10.1016/j.exppara.2014.12.001.

4. Emmanuel, M., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T., and Datta, S. Small GTPase Rab21 mediates Fibronectin induced actin reorganization in *Entamoeba histolytica*: implications in pathogen invasion. *PLoS Pathog* 11(3):e1004666, 2015. doi: 10.1371/journal.ppat.1004666.

5. Picazarri, K.,* Nakada-Tsukui, K.,* Tsuboi, K., Miyamoto, E., Watanabe, N., Kawakami, E., and Nozaki, T. Atg8 is involved in endosomal and phagosomal acidification in the parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 17, 1510-1522, 2015 (* equal contribution) doi: 10.1111/cmi.12453

6. Mi-ichi, F.,# Miyamoto, T., Takao, S., Jeelani, G., Hashimoto, T., Hara, H., Nozaki, T.,# and Yoshida, H. *Entamoeba* mitochondria play an important role in encystation by association with cholesteryl sulfate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(22):E2884-90, 2015. doi: 10.1073/pnas.1423718112. (# correspondence) pii: 201423718.

7. Mori, M., Jeelani, G., Masuda, Y., Sakai, K., Nakada-Tsukui, K., Waluyo, D., Tarwadi, Watanabe, Y., Nonaka, K., Matsumoto, A., Omura, S., Nozaki, T.#, and Shiomi, K. # Identification of natural inhibitors of *Entamoeba histolytica* cysteine synthase from microbial secondary metabolites. *Front Microbiol.* 6, 962, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00962 (# correspondence)

8. Chiba, Y., Kamikawa, R., Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., and Nozaki, T. Discovery of PPI-type phosphoenolpyruvate carboxykinase genes in eukaryotes and bacteria. *J Biol Chem* 290, 23960-23970, 2015. doi: 10.1074/jbc.M115.672907

9. Mi-ichi, F.* Nozawa, A.* Yoshida, H.,

Tozawa, Y.[#], Nozaki, T.[#] Evidence that *Entamoeba histolytica* mitochondrial carrier family links mitochondrial and cytosolic pathways through exchange of PAPS and ATP. *Eukaryot Cell* 14(11):1144-1150, 2015 (*Equal first authors; [#]Double correspondence) doi: 10.1128/EC.00130-15.

10. Santos, H. J., Imai, K., Hanadate, Y., Fukasawa, Y., Oda, T., Mi-ichi, F., and Nozaki, T. Screening and discovery of lineage-specific mitochondrial membrane proteins in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2016, in press. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.01.001.

11. Jeelani, G. and Nozaki, T. *Entamoeba* thiol-based redox metabolism: a potential target for drug development. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2016, in press. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.01.004.

12. Hanadate, Y., Saito-Nakano, Y., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Endoplasmic reticulum-resident Rab8A GTPase is involved in phagocytosis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 2016 doi: 10.1111/cmi.12570. in press

13. Verma, K., Nozaki, T., and Datta, S. Role of EhRab7A in phagocytosis of type 1 fimbriated *E. coli* by *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* 102:1043-1061, 2016. doi: 10.1111/mmi.13533. PMID:27663892

[学会発表] (計 10 件)

1. Nozaki, T. Unique evolution of metabolism, pathogenesis, and organelles in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. (plenary lecture) International Conference of Parasitology XIII, Mexico City, Mexico, Aug 10-15, 2014.

2. Nozaki, T. Novel lysosome transport mechanisms of the enteric protozoan *Entamoeba* (workshop; invited) International Conference of Parasitology XIII, Mexico City, Mexico, Aug 10-15, 2014.

3. 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.

4. 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.

5. 津久井久美子、丸茂このみ、富井健太郎、野崎智義、Ligand heterogeneity of the cysteine protease binding protein family in the parasitic protist *Entamoeba histolytica* 腸管寄生性原虫赤痢アメーバにおけるリソソーム酵素輸送受容体分子ファミリー (CPBF) のリガンド多様性とドメイン構造の解析 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25~27日, 神奈川県横浜市ポスター発表

6. 丸茂このみ、野崎智義、津久井久美子、赤痢アメーバにおけるリソソーム酵素輸送受容体ファミリーの解析 第22回分子寄生虫学ワークショップ・第13回分子寄生虫マラリアフォーラム合同大会 2014年8月31~9月3日, 帯広市 口頭発表

7. 津久井久美子、丸茂このみ、中野由美子、野崎智義 (2014) 寄生性原虫赤痢アメーバにユニークなリソソーム酵素輸送受容体群. Unique lysosomal targeting receptors in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 第66回日本細胞生物学会大会. シンポジウム「比べてみよう:細胞ダイナミクスの共通性と独自性」2014年6月11日-13日. 奈良.

8. 川野哲郎, 中野由美子, Gil M. Penuliar, 野崎智義. 赤痢アメーバの病原因子システインプロテアーゼの輸送を制御する Rab11 の解析. 第24回分子寄生虫学ワークショップ/第14回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 2016年8月21日-24日. 帯広.

9. 津久井久美子, 柴田久美子, 丸茂このみ, 渡辺菜月, 宮本絵梨, Ratna Wahyuni, 中野由美子, 野崎智義. 腸管寄生原虫赤痢アメーバの食食胞成熟の分子機構. 第24回分子寄生虫学ワークショップ/第14回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会. 2016年8月21日-24日. 帯広.

10. 津久井久美子, 渡辺菜月, 宮本絵梨, Ratna Wahyuni, 柴田久美子, 中野由美子, 富井健太郎, 野崎智義. 赤痢アメーバ原虫における Atg8 を介した食食胞成熟の分子機構. 第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30-12月2日. 横浜.

〔図書〕（計 1 件）

1. Kumiko Nakada-Tsukui, and Tomoyoshi Nozaki. Molecular basis of the trafficking of cysteine proteases and other soluble lysosomal proteins in *Entamoeba histolytica*. In "Amebiasis: Biology and Pathogenesis of *Entamoeba*" Edited by Tomoyoshi Nozaki and Alok Bhattacharya. pp 279-304, Springer, 2015, ISBN 978-4-431-55199-7.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 智義 (NOZAKI, Tomoyoshi)
国立感染症研究所・寄生動物部・部長
研究者番号：60198588

(2) 研究分担者

津久井 久美子 (TSUKUI, Kumiko)
国立感染症研究所・寄生動物部・主任研究官
研究者番号：00420092

中野(斉藤) 由美子
(NAKANO(SAITO), 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

橋本 哲男 (HASHIMOTO, Tetsuo)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号：50208451

千葉 洋子 (CHIBA, Yoko)
2016年3月まで
筑波大学・生命環境系・助教
2016年4月より
国立研究開発法人 海洋研究開発機構・
国際ポストドクトラル研究員
研究者番号：70638981