

研究課題別評価

1 研究課題:プロテオーム解析による赤痢アメーバの病原機構の解明

2 研究者氏名:野崎 智義

グループメンバー:佐藤 暖(研究期間:H16.4.1~H16.8.31)

繁田 泰男(研究期間:H15.5.1~H17.3.31)

岡田 麻美(研究期間:H14.4.1~H15.3.31)

3 研究の狙い:

嫌気性原虫赤痢アメーバはヒトの大腸に寄生し、複数の病原因子を細胞外に放出して免疫細胞を融解したり、感染局所の組織破壊を起こすとともに、破壊された細胞・組織を活発に貪食(ファゴサイトーシス)・除去して寄生を成立させる。病原因子の分泌や貪食は赤痢アメーバの寄生に不可欠であり、その分子機構を解明することは、赤痢アメーバの病原機構を理解するために不可欠である。我々は分泌や貪食を調節する細胞機構としての小胞輸送に注目し、赤痢アメーバの小胞輸送の特殊性を分子レベルで明らかにすることにより、赤痢アメーバの小胞輸送が病原機構にどう関与するかを解明することを目指した。

4 研究成果:

1. プロテオーム解析によるファゴソームタンパク質の網羅的同定

貪食過程に関わる分子を網羅的に同定することを目的として、貪食胞(ファゴソーム)を分離・精製し、ファゴソームに存在するタンパク質をプロテオーム解析により同定した。これによりファゴソームの形成、成熟の過程でファゴソームに動員される160を超えるタンパク質とそれぞれのタンパク質の動態を明らかにした。赤痢アメーバに特異的な細胞表面レクチン、システインプロテアーゼ(CP)を含む様々な加水分解酵素、Rabタンパク質などが同定された。約40%のタンパク質はいかなる既知のタンパク質とも有意な同一性をもたない新規タンパク質であり、赤痢アメーバ特異的なファゴソーム成熟機構が示唆された。また、これまで細胞表面やミトコンドリアに存在すると予測されていたタンパク質がファゴソームに構成的に見られた。以上の結果をもとに赤痢アメーバのバーチャルファゴソームを構築することができ(図1)、赤痢アメーバのファゴソーム形成・成熟に関するタンパク質群の全体像とその詳細な動態が解明された。同時に、赤痢アメーバのファゴソーム成熟過程の特殊性の一端が分子レベルで明らかになった。

2. 赤痢アメーバの貪食におけるRabタンパク質の役割の解明

低分子量GTPaseRabタンパク質は特定の小胞間の特異的な結合と融合(docking/fusion)に機能する重要なタンパク質である。我々は貪食の際に機能する数種類のRabタンパク質の特異的な役割を明らかにした。赤痢アメーバがほ乳動物の赤血球に接着すると、貪食が開始する前に、ファゴソームと独立した2-3 μ mの空胞(prephagosomal vacuole, PPV)が形成された。この空胞の形成には少なくともRab5とRab7Aの2種類のRabが関与していた。Rab5はPPV形成に、Rab7AはPPVの形成とPPVを介するリソソーム分解酵素のファゴソームへの輸送に機能していた。PPVは他種生物に見られないユニークなオルガネラであり、リソソーム由来の分解タンパク質であるCPやアメーバポア(AP)などを活性化し貯蔵する準備空胞であると予想された(図2)。

更にRab7Aの機能を調節するタンパク質としてRab7A結合タンパク質を生化学的精製により単離したところ、他種生物でレトロマー(retromer)と呼ばれている複合体と似た構造を示す複合体を獲得した。赤痢アメーバのレトロマー様複合体は赤痢アメーバRab7Aと特異的に結合し、リソソーム酵素の輸送をネガティブに制御していた(図2)。複合体との結合を介したRab7Aの調節機構は

他種生物と異なった前例のない制御機構であった。

赤痢アメーバの小胞輸送の特殊性として、Rab の高度の多様性が挙げられる。一般に酵母などの単細胞生物では 7-11 種、多細胞生物のハエ、線虫、植物、ヒトでも 29-57 種の Rab が存在するに過ぎないのに対して、単細胞生物である赤痢アメーバは少なくとも 90 種の Rab タンパク質を有する。赤痢アメーバの Rab の多様性を示す 1 つの例としてヒトでは存在しない Rab7 のアイソタイプの存在が挙げられる。赤痢アメーバでは少なくとも 8 種類の Rab7 アイソタイプが存在する。我々は上記 Rab7A に続いて Rab7B, Rab7D の貪食の小胞輸送における役割を明らかにした(図 2)。これらの一連の成果により赤痢アメーバの貪食における Rab7 アイソタイプの貪食における特異的な役割が明確になった。

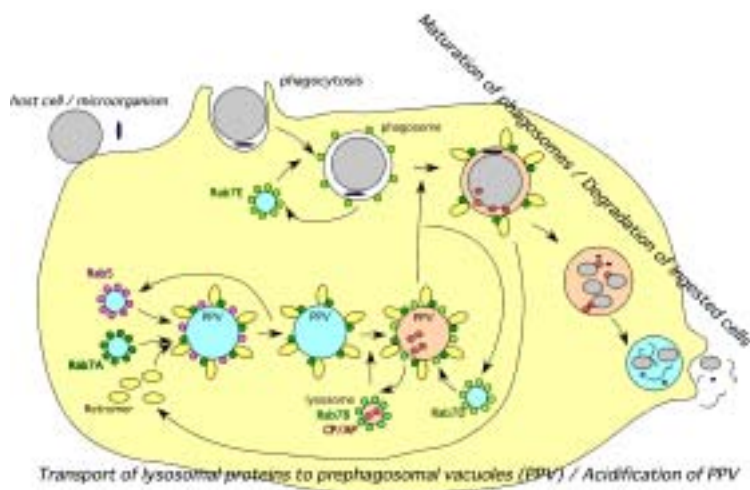
3. 赤痢アメーバにおける貪食過程の可視化

貪食におけるファゴソームの成熟過程をリアルタイムで追跡するシステムを構築した。赤痢アメーバのファゴソーム内腔はファゴソームの形成後 2 分以内に pH4.5 まで低下し、少なくとも数時間酸性化されたまま維持された。また、貪食胞における緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現した酵母やリーシュマニア原虫の分解も半減期 10 分以内であり、効率的な酸性化と分解が急速に起こっていることが明らかになった。病原性の効率の異なる複数の赤痢アメーバ株と非病原性関連種である *E. dispar* を用いてファゴソームの酸性化と分解の比較を行った。ファゴソームの酸性化の効率とファゴソームでの GFP 分解は良く相関していたが、酸性化・分解の効率は必ずしも見かけの病原性と相関していなかった。以上のことはファゴソームの酸性化が分解機構と密接に相関していることを示していると同時に、ファゴソームの酸性化・分解・成熟の効率だけが赤痢アメーバ原虫の病原性を規定しているのではなく、分解酵素の細胞内での分別輸送・分泌の調節がより密接に病原性に関与していることが予想された。

図 1 プロテオーム解析によるバーチャルファゴソーム



図 2 赤痢アメーバにおけるファゴソームの形成と成熟過程



5 自己評価:

赤痢アメーバの病原機構を小胞輸送という観点からとらえた研究を目指し、十分な成果を挙げることができたのではないかと考えている。第1に食食過程に関与する分子を網羅的に同定することにより、他種生物との相似及び赤痢アメーバにおける特殊性が明らかにされただけでなく、今後病原性と直接リンクするタンパク質を解明する基盤を構築することができた。第2に病原機構の一部である食食の小胞輸送に関与する個別のタンパク質の機能を解明する過程で、赤痢アメーバ原虫に特異的な細胞内オルガネラの同定と空胞の成熟機構の発見に至った。第3に赤痢アメーバにおける小胞輸送を分子プローブを用いて可視化することに成功した。また、本報告書には記載しないが、赤痢アメーバに選択的に存在するアミノ酸代謝酵素メチオニンガンマリアーゼ、並びに、低分子量 GTPase の脂質修飾酵素の発見とこれら標的酵素に対する創薬も達成しており、目指した研究提案の多くを達成することが出来たのではないかと考える。しかしながら、命題の中心である食食・分泌の病原機構における必須性に関しては、今後の研究で明らかにしたい。特に、食食に関与するどの分子が病原性と最も高く相関しているかを、病原性株・非病原性分離株間、及び赤痢アメーバ・非病原性アメーバ間での量・動態の比較により発見し、その機能を逆遺伝学的手法を用いて解明する予定である。また、赤痢アメーバ全遺伝子を網羅した DNA マイクロアレイを作製し、病原性に強く相関する小胞輸送、或いはそれ以外の経路に関与する遺伝子を網羅的に同定したいと考えている。

6 研究総括の見解:

腸管寄生原虫赤痢アメーバの小胞輸送の特殊性を分子レベルで明らかにすることにより、赤痢アメーバの小胞輸送が病原機構にどう関与するかを解明することを目的とした研究である。赤痢アメーバの食食の特殊性を明らかにするとともに病原性に直接関与する蛋白因子を解明した。また食食の小胞輸送に関与する蛋白の機能を解明して、赤痢アメーバに特異的な細胞内オルガネラの同定と空胞の成熟機構を発見した。さらに小胞輸送を分子プローブを用いて可視化することに成功し、初期の研究目的を達成した。

7 主な論文等:

論文

1. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a

- limited geographic area. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4081-90.
2. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., and Nozaki, T. (2003) Geographic diversity of genotypes among *Entamoeba histolytica* field isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3748-3756.
 3. Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Nozaki, T., Takeuchi, T., and Matsubara, C. (2003) Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp. Isolates. *Parasitol. Int.* 52, 169-173.
 4. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydrogenase from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.* 375, 729-736.
 5. Tokoro, M., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) A novel sulfur-containing amino acid degradation enzyme methionine γ -lyase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 278, 42717-42727
 6. Ghosh, S., Chan, J., Lea, C.R., Meints, G.A., Lewis, J.C., Tovian, Z., Flessner, R., Loftus, T.C., Bruchhaus, I., Fradley, K.L., Kendrick, H., Croft, S., Kemp, R., Kobayashi, S., Nozaki, T., and Oldfield, E. (2004) Effects of Bisphosphonates on the Growth of *Entamoeba* and *Plasmodium* species *in vitro* and *in vivo*. *J. Med. Chem.* 47, 175-187.
 7. Kumagai, M., Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 2316-2323.
 8. Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Nozaki, T. (2004) An intestinal parasitic protist *Entamoeba histolytica* possesses a non-redundant NIF-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* 279, 16863-16874.
 9. Ali, V., Shigeta, Y., Hashimoto, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular and biochemical characterization of D-phosphoglycerate dehydrogenase from *Entamoeba histolytica*: a unique enteric protozoan parasite that possesses both phosphorylated and non-phosphorylated serine metabolic pathways. *Eur. J. Biochem.* 271, 2670-2681.
 10. Saito-Nakano, Y., Yasuda, and Nozaki, T. (2004) Unique role of Rab5 and Rab7 in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279, 49497-49507.
 11. Loftus, B., Anderson, I., Davies, R., Alismark, U. C. M., Samuelson, J., Amedeo, P., Roncaglia, P., Berriman, M., Hirt, R. P., Mann, B. J., Nozaki, T., Suh, B., Pop, M., Duchene, M., Ackers, J., Tannich, E., Leippe, M., Hofer, M., Bruchhaus, I., Willhoeft, U., Bhattacharya, A., Chillingworth, T., Churcher, C., Hance, Z., Harris, B., Harris, d., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Squares, R., Whitehead, S., Guillen, N., Gilchrist, C., Stroup, S. E., Bhattacharya, S., Lohia, A., Foster, P. G., Sicheritz-Ponten, T., Weber, C., Singh, U., Mukherjee, C., Petri, W. A. J., Clark, C. G., Embley, T. M., Barrell, B., Fraser, C. M., and Hall, N. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* (in press)
 12. Okada, M., Huston, C. D., Mann, B. J., Petri, Jr., W. A., Kita, K., and Nozaki, T. (2005) Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* (in press).

13. Saito-Nakano, Y., Loftus, B. J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab small GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* (In press).
14. Beck, D.L., Boettner, D., Dragulev, B., Ready, L., Mackey, A.J., Nozaki, T., Pearson, W.R., and Petri, Jr., W.A. (2005) Identification and gene expression analysis of a large family of transmembrane kinases related to the Gal/GalNAc lectin in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* (in press)
15. Nozaki, T., Ali, V., and Tokoro, M. (2005) Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. *Adv. Parasitol. Review* (in press).

招待講演

1. Nozaki, T. (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Amitochondriate Protozoan Genome Sequencing Projects: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, and *Giardia lamblia*. Cambridge, U.K., May 20-21, 2002
2. Nozaki, T. (2003) Functional characterization of a complex associated with small GTPase Rab7, which plays an important role in phagocytosis. EMBO Workshop on pathogenesis of amebiasis: from genomics to disease Paris, May 19-21, 2003.
3. Nozaki, T. (2004) Iron-sulfur cluster formation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*: unique non-redundant nitrogen fixation (NIF)-like system in the anaerobic parasite. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug 30-Sept 2, 2004, Awaji, Japan.
4. Nozaki, T. (2004) *Entamoeba histolytica* phagosome proteome "Genomics and Biology of the Amitochondriates" Sept 18-19, 2004, Woods Hole.
5. Nozaki, T., Nakada-Tsukui, K., Mitra, B. N., Okada, M., Saito-Nakano, Y., Huston, C. D., Mann, B. J., and Petri, Jr., W. A. (2004) Vesicular trafficking in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. EMBO Workshop on Pathogenesis of Amoebiasis: From Genomics to Disease, Nov 16-20, 2004, Ein Gedi, Israel.

他国内3件