

## 赤痢アメーバの病原性に関与する Rab11B エフェクタータンパク質の同定

川野 哲郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 橋本 哲男 (筑波大学 生命環境系)

## 背景

寄生原虫赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は宿主であるヒトの腸管に寄生し、アメーバ赤痢の原因となる (1)。WHO の推定によれば、世界人口のおよそ 1% が *E. histolytica* に感染しており、毎年 10 万人がアメーバ赤痢に因って死亡している。このため *E. histolytica* の医学的・公衆衛生的重要性は高く、その感染機構や病原性に関する知見の充実が望まれている。

*E. histolytica* はヒトの大腸粘膜面に潰瘍を形成し、赤血球や細菌を食食することで増殖する。組織の障害と食食胞内での分解に係る病原因子の 1 つとして cysteine protease (CP) が報告されている。なかでも CP-A5 の発現抑制株は培養細胞への障害性及び動物感染実験での肝膿瘍形成能が低下することから、CP-A5 は病原性に重要である (2)。

一般に CP などの加水分解酵素の分泌は真核生物に保存された小胞輸送が担っている。細胞内の小胞輸送において、小胞の受容膜への融合は低分子量 GTPase である Rab により調節されている。*E. histolytica* においては、これまでに 102 種類の Rab が発見されており (3)、Rab による細胞内輸送の制御が複雑化していることが推測される。そのうちの Rab11B を大量発現する形質転換株では CP の分泌が上昇することから、Rab11B は CP の輸送に関与することが報告されている (4)。

先行研究により、質量解析を用いて活性化型 Rab11B に特異的に結合するタンパク質が網羅的に解析されている。本研究では同定された Rab11B エフェクター候補タンパク質が細胞内で実際に Rab11B と結合するかどうかを確認を試みた。

## 方法

質量解析によって得られた Rab11B エフェクタータンパク質の候補 94 種のうち、多くのペプチドが得られた遺伝子として、クラスリン被覆小胞の形成に必要な adaptor protein (AP) 複合体の adaptin large subunit (EHI\_013040, EHI\_196890) と輸送小胞が細胞膜へ繫留されるのに必要なエキソシスト複合体の因子 (Sec6: EHI\_081420) のホモログが含まれていた。分子系統解析により、候補の adaptin がトランスゴルジネットワーク (TGN) からの輸送に必要な AP-1 複合体の因子であるかどうか検討を行った。次に *E. histolytica* HM-1:IMSS Cl-6 株を用い、候補タンパク質に HA または GFP タグを付加した融合遺伝子を発現する形質転換株を作製した。抗タグ抗体を用いた間接蛍光抗体法 (indirect immunofluorescence assay: IFA) により、候補タンパク質と Rab11B の細胞内での共局在を観察した。また、市販の抗タグ抗体結合アガロースを用いた共免疫沈降法 (co-immunoprecipitation: Co-IP) により、候補タンパク質とともに Rab11B が共沈するかどうかを確認した。

## 結果

活性化型 Rab11B に特異的に結合するタンパク質の候補であるものを含め、adaptin large subunit は *E. histolytica* 標準株

(HM-1:IMSS) のゲノムには 13 種類存在していた。他種生物では TGN からの小胞の形成に  $\beta 1$  と  $\gamma$ -adaptin から構成される AP-1 複合体が、細胞膜からの輸送には  $\beta 2$  と  $\alpha$ -adaptin から構成される AP-2 複合体が機能する。分子系統解析により他種生物のホモログと比較した結果、候補タンパク質 EHI\_196890 は  $\gamma$ -adaptin であることが支持された。もう一つの EHI\_013040 は  $\beta 1$  か  $\beta 2$ -adaptin であり、subfamily の判別は困難であった。両者の結果を考慮すると、Rab11B エフェクターの候補に TGN からの輸送に必要な AP-1 複合体が含まれていたと考えられる。

$\gamma$ -adaptin の N 末端に HA タグを融合させた形質転換株を作成し、細胞分画を行ったところ、HA- $\gamma$ -adaptin は膜画分と可溶性画分に分画された。抗 HA 抗体と抗 Rab11B 抗体を用いて IFA を行ったところ、HA- $\gamma$ -adaptin と Rab11B の共局在が部分的に確認された。しかし、HA- $\gamma$ -adaptin を bait とした Co-IP では、Rab11B の共沈は検出されなかった。

N 末端に GFP 融合遺伝子を付加した  $\beta$ -adaptin もしくは Sec6 の形質転換株を作成し細胞内局在を観察したが、Rab11B との共局在は IFA では観察されなかった。これらを bait とした Co-IP では、Rab11B の共沈は検出されなかった。

## 考察

IFA により  $\gamma$ -adaptin と Rab11B との部分的な共局在が確認された一方で、 $\gamma$ -adaptin を bait とした Co-IP では Rab11B は検出できなかったが、このことは必ずしも  $\gamma$ -adaptin が Rab11B エフェクターの可能性を否定するものではない。細胞内での活性化型 Rab11B の量が少ないために、Rab11B と結合している  $\gamma$ -adaptin の量が検出限界を下回っている可能性がある。今後、定常活性化型の Rab11B を発現する大量発現株を作製し、再度 Co-IP を試みる予定である。

他種生物では、TGN から細胞膜へ向けての輸送に Rab11、その下流に Rab8 とエキソシスト複合体が機能することが報告されている。さらに、一部の輸送経路では Rab11 とエキソシスト複合体の別の因子 Sec15 との結合も報告されている。赤痢アメーバでは、Rab8 は TGN には存在しないことが分かっているため、本研究によって Rab11B と Sec6 との相互作用が明らかになれば、赤痢アメーバ特異的な輸送経路が解明できると考えている。

## 参考文献

- (1) Ralston KS and Petri WA Jr., Trends Parasitol. 2011 (6):254-63.
- (2) Irmer H *et al.*, Mol. Microbiol. 2009 (3):658-67.
- (3) Nakada-Tsukui K *et al.*, Experi. Parasitol. 2010 (126): 334-47.
- (4) Mitra BN *et al.*, Cell. Microbiol. 2007 (9): 2112-25.