

赤痢アメーバにおけるグリセロール生合成経路の同定と解析

山岸 美菜 (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・目的

赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)はアメーバ赤痢症を引き起こす寄生原虫である。世界人口の約1%が感染し、年間4~7万人の死者が出る。また、近年日本での感染者数は年々増加しているため、国内でも問題になっている。赤痢アメーバは大腸で腸管に侵入して炎症を引き起こすが、組織侵入をする際に酸化ストレスが加わる。赤痢アメーバは微好気性で酸化ストレスに弱いと考えられるにもかかわらず、それに耐えて組織侵入することができる。そこで、組織侵入に酸化ストレス応答が重要だと考え、赤痢アメーバの酸化ストレスに対する防御機構に注目した。*E. histolytica* は真核生物が一般的に持つ抗酸化防御システムを欠くが、代わりにまだ同定されていない抗酸化防御システムを持つと考えられる。先行研究によって、酸化ストレスが加わると赤痢アメーバの解糖系が抑制され、解糖系から分岐している、グリセロールを作る経路の中間、最終代謝産物が増加することが明らかになった。このことから、酸化ストレス防御にグリセロール代謝経路が重要であるということが示唆された。グリセロール代謝経路の機能解析は寄生虫の酸化ストレス耐性のさらなる理解につながる。また、グリセロール代謝経路は寄生虫の生存への重大なプロセスへ関与する。寄生虫の生存に不可欠な代謝経路は治療や予防薬作製の候補となる。したがって、グリセロール代謝経路が抗アメーバ薬の作製へのターゲットになりうると考えられる。

グリセロール代謝経路は一般的に glycerol-3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)と glycerol kinase(GK)という2つのタンパク質が触媒しており、*E. histolytica*にもその候補遺伝子がある。*E. histolytica*のG3PDHとGKのグリセロール合成経路における機能、またこれらの酵素の酸化ストレス下での解糖系からグリセロール経路への流れの調節方法を明らかにすることが重要である。

そこで本研究は酸化ストレス下における *E. histolytica* G3PDH と GK の候補遺伝子の役割を明らかにすることを目的として、2つの候補遺伝子の機能解析を行った。

材料・方法

機能が生化学的に確認されている G3PDH と GK のタンパク質の配列を query として、*E. histolytica* のゲノムデータベース (<http://amoebadb.org/amoeba/>) に対してホモロジー探索をすることで、G3PDH と GK の遺伝子の候補を同定した。

次に、*E. histolytica* の G3PDH と GK の系統解析を行った。系統樹の推測には、RAxML 法、LG + F + G4 モデルを使用した。

次に、*E. histolytica* HM-1:IMSS Cl-6 株を用い、G3PDH または GK 候補タンパク質に HA タグを付加した融合遺伝子を発現する形質転換株を作成した。そして、抗 HA タグ抗体を用いた間接蛍光抗体法および細胞分画法により候補タンパク質の細胞内での局在を観察した。

結果・考察

EHI_099700 および EHI_164850 をそれぞれ *EhG3PDH*、*EhGK* と同定した。G3PDH は FAD dependent oxidoreductase によって触媒される。赤痢アメーバの G3PDH はヒトなどの一般的な G3PDH とは異なり、G3PDH と予測されるドメインの C 末端側に鉄硫黄クラスター、Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase をコードするドメイン、metal-binding ドメインを有する。この形の Fusion タンパク質を持つ生物は fornicates、entamoebids、spilochaetes、actinobacteria のみであった。

E. histolytica G3PDH の、FAD dependent oxidoreductase をコードするドメインと鉄硫黄クラスターを含む N 末端側と、Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase をコードするドメインと metal-binding ドメインを含む C 末端側、GK の系統樹を推測した。N 末端側と C 末端側を別のタンパク質として分けて持つ生物や、どちらかの配列のみを持つ生物がいるため、N 末端側と C 末端側をそれぞれ解析した。その結果推測された最尤系統樹では、N 末端側については、fornicates と、*E. histolytica* を含む entamoebids のものがクレードを作った。そしてその姉妹群として、Cyanobacteria と Green non sulfur bacteria 由来のタンパク質が単系統であった。したがって、N 末端側は Cyanobacteria と Green non sulfur bacteria の共通祖先から fornicates または entamoebids の共通祖先へ水平伝播し、その後さらに fornicates、entamoebids 間で水平伝播したと考えられる。一方で、C 末端側は、*E. histolytica* を含む真核生物は単系統になった。また、firmicutes と α -proteobacteria が姉妹群となったが、サポートするブートストラップ値が低いいため、*E. histolytica* G3PDH の C 末端側の起源については知ることができなかった。また、配列が fusion したポイントは現時点では予測不可能である。GK については、entamoebids 以外の全ての真核生物が単系統となった。Entamoebids については、単系統となり、姉妹群は Mollicutes bacterium であった。サポートするブートストラップ値が低いいため、具体的な生物の特定には至らなかったが、*E. histolytica* GK の起源はバクテリアであることが明らかになった。

IFA により HA-G3PDH と HA-GK は細胞質と細胞膜に存在することが示された。さらに細胞分画により G3PDH と GK は共に主に細胞質部分に存在し、一部細胞膜に結合していることが明らかになった。

G3PDH と GK の機能解析のため、G3PDH と GK の遺伝子発現抑制株を作製した。今後これらの株を用いて、酸化ストレス有無での、遺伝子発現抑制株と遺伝子過剰発現株と野生型の間での、表現型の違いを明らかにする。さらに *EhG3PDH* と *EhGK* の役割を明らかにするために、*E. histolytica* G3PDH と GK のリコンビナントタンパク質をそれぞれ大腸菌で発現させ、精製し、生化学的な性質の詳細を実証する。

参考文献: Afzal Husain et al., PLOS. 2012 (6)