

赤痢アメーバ環境耐性を担う“球形”シスト壁の形成機構の解析

長崎大学熱帯医学研究所 共同研究室

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 原虫生化学分野・教授

見市 文香

背景と目的

赤痢アメーバは、ヒトの大腸に寄生しアメーバ赤痢症を引き起こす寄生原虫である。ヒトへの感染はシストの経口摂取により生じ、感染成立後には下痢などの症状を引き起こす（図1）。治療薬に限られ、有効なワクチンも存在しないことから、アメーバ赤痢症の病原性の解明、新規薬剤開発が喫緊の課題である。我々は、赤痢アメーバのシストの形成機構に着目した研究を進めている。シストが外界の環境変化に耐えることは、次の宿主への伝播に不可欠な過程である。シストの環境耐性には、“シスト壁”と“細胞膜”が深く関与しているとこれまで考えられてきたが、分子機構については不明な点が多かった。

本研究では、赤痢アメーバによる宿主への感染成立という重要な戦略の一旦を担う「シスト壁形成におけるキチナーゼの役割」の分子機構の解明を通して、休眠化機構の理解を目指す。キチナーゼ阻害剤の探索から新規伝播阻止薬開発につながるリード化合物の提供、そしてアメーバ赤痢という感染症の拡大を阻止するストラテジーの提示を最終目標とする。

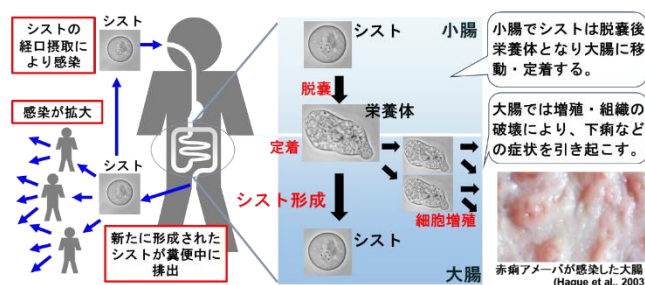


図1、赤痢アメーバの生活環

助成期間の成果と考察

○シスト壁の構成成分に対する抗体の作製とそれぞれの時空間的性状の解析

我々はシスト壁を構成するタンパク質の中で検出量が高い Jacob1、Jacob3、Jessie3A、Jessie3B、キチナーゼ1に対する抗体を作製した。大腸菌でそれぞれの組み換えタンパク質（全長もしくは部分配列）を発現、精製を行い抗原とした。シスト形成を誘導した細胞を用いた解析により、個々のタンパク質のシスト壁内における時空間的性状を明らかにした（論文作成中）。

○キチナーゼと Jacob1、Jacob3、Jessie3A、Jessie3B の相互作用の解析

我々はこれまでに、シスト壁のキチン分解酵素キチナーゼの機能解析および新規阻害剤の探索を行った結果として1種類の新規キチナーゼ阻害剤（Pathogen Box、D-B-09）を得ている。D-B-09 存在下でシスト形成を誘導すると、正常な球形シ

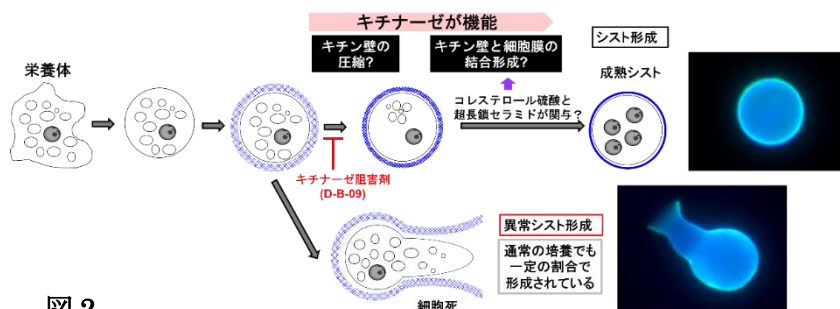


図2

ストではなく異常なつぼ型 (pot-like structure) シストが形成される (図 2、Mi-ichi *et al*, *Microbiol Spectr*, 2021)。

今回、D-B-09 存在下、つまりキチナーゼの機能を阻害した状態で誘導したつぼ型シストにおける Jacob1、Jacob3、Jessie3A、Jessie3B のタンパク質の局在を解析した。結果、キチン繊維(WGA-Alexa647 で可視化)と局在が一致するもの、一致しないもの、また、キチナーゼ阻害により局在に影響の有無など、それぞれのタンパク質の相互作用について特異性を見出した (論文作成中)。

○キチナーゼを阻害する化合物の探索

我々は既に、1 種類の新規キチナーゼ阻害剤 (Pathogen Box、D-B-09) を得ている。D-B-09 がヒトの培養細胞に対する影響の解析したところ、高い細胞毒性を示した。そこで、アメーバ赤痢伝播阻止薬の新規リードと成り得るキチナーゼ阻害剤取得のため、化合物ライブラリーのサイズを大きくしてキチナーゼ活性に対する阻害効果でスクリーニングを行った。1440 化合物中 4 化合物が 10 μ M の濃度で、活性を 80%以上抑制することを見出した。4 化合物のうち購入できた 3 化合物について、詳細な解析をおこなったところ細胞毒性が低いこと、酵素活性は強く阻害するものの、シスト形成に対しては残念ながら効果がないことを見出した。現在、さらに 8460 化合物を用いたスクリーニングを進めている。

○キチン壁と脂質成分との相互作用についての解析

我々は赤痢アメーバのシスト形成モデル生物である *Entamoeba invadens* を用いて、“シスト形成”に伴い変動する脂質の網羅解析を行い、シスト形成においてはセラミド、特に超長鎖 (炭素数 26-30) ジヒドロセラミドの量が大きく増加していることが明らかにした (Mi-ichi *et al*, *mSphere*, 2021)。超長鎖ジヒドロセラミドの他にもリゾリン脂質の、リゾホスファチジルセリン、リゾホスファチジルイノシトールが上昇していることも既に報告しており、今回これら脂質種による膜制御とキチン壁との相互作用の解析を開始した。最初に、我々が解析した脂質の網羅解析のデータに基づき新たな脂質代謝の代謝地図を作製した (Mi-ichi *et al*, 論文投稿中)。その中から、大きな変動を示した脂質種の合成に関与する酵素をコードする遺伝子群の、シスト形成における発現解析を行い、合成時期の解析を行った。今回大きな変動が確認された各脂質種と、キチン線維の可視化 (各脂質種に対する抗体と WGA-Alexa647 によるキチン染色) を行うことで、現在キチン壁と脂質成分との相互作用について解析を進めている。

今後の見通し

キチン線維の構造形態について、今回構造タンパク質を同時に解析することで、キチナーゼの機能をより明解にすることが出来た。ただし、共焦点レーザー顕微鏡による解析には解像度の限界がありため、今後は当初予定していた電子顕微鏡解析を進める必要があり、現在進行している。今回作成した抗体は、電子顕微鏡解析においても抗原を認識できることまでは確認できており、今後の解析結果が待たれる。

現在赤痢アメーバキチナーゼの阻害剤としては、D-B-09 のみを得ているが、宿主細胞に対して細胞毒性があることが明らかとなった。今後、アメーバ赤痢伝播阻止薬の新規リードと成り得る化合物の取得するべく、スクリーニングする化合物の数を増やし、より強力で、また、宿主細胞にたいし毒性を示さない化合物を取得することを試みる。現在 8460 化合物は入手済みであり、スクリーニングを進めることで、新規伝播阻止薬開発につながるリード化合物の提供、そしてアメーバ赤痢という感染症の拡大を阻止するストラテジーの提示を目指したいと考えている。