

平成17年度

# 若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

# 若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## HS研究

### 第1分野

#### 課題番号

KH13301 テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告） 西田基宏 …… 1

KH13301 テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告） 西田基宏 …… 6

KH13302 再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発 川端健二 …… 10

### 第2分野

KH23303 腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究 増田智先 …… 15

KH23304 Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用 中道一生 …… 22

KH23306 吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究 伊澤晴彦 …… 27

KH23307 アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発 大喜多 肇 …… 34

KH23331 寄生性原虫の生育に必要な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究 中野由美子 …… 39

### 第3分野

KH33308 向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究 橋本亮太 …… 47

KH33309 ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測 小林カオル …… 55

KH33310 薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究 田辺公一 …… 60

KH33332 制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究 川上浩司 …… 65

### 第5分野

KH53312 LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究 伊豫田 淳 …… 69

KH53313 遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発 岡田直貴 …… 74

KH53314 PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究 小島伸介 …… 84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc $\gamma$ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

## 寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究

所属 国立感染症研究所・寄生動物部  
研究者 中野 由美子

研究要旨 コレステロールは赤痢アメーバの生育にとって不可欠な因子であることを証明した。さらに主要な病原因子であるシステインプロテアーゼの活性化がコレステロールによって濃度依存的に調節されていた。よって、赤痢アメーバ特異的なコレステロール代謝系の解析が、新規抗アメーバ症薬剤開発のための基盤を提供できると考えられた。

### A. 研究目的

赤痢アメーバ症は、赤痢アメーバによって引き起こされる、下痢、大腸炎、肝膿瘍を主症状とする感染症であり、国内では年間500例の感染と、数例の死亡が報告されている。国内だけでなく世界では、熱帯地域を中心に世界人口の1%が赤痢アメーバ症により毎年死亡していると報告されている。これまで抗赤痢アメーバ症の薬剤としては、嫌氣的呼吸鎖をターゲットとしたメトロニダゾールが広く用いられているが、催奇性などの副作用、薬剤耐性株の出現の報告、腸管内シストキャリアーに効きにくいなどの点から新たな薬剤開発が望まれている。

本研究では新規の抗薬剤開発のためのターゲットとして、赤痢アメーバの病原因子であるアメーバポアの活性を左右する脂質成分の代謝と細胞内輸送に着目する。アメーバポアは古くから赤痢アメーバで研究されて来た膜穿孔ペプチドであり、近年コレステロール依存性サイトリシンのファミリーであることが報告された。そして赤痢アメーバにとってコレステロールは生育に必要な脂質であることが報告されているが、その細胞内における機能、取り込みに関する分子生物学的研究は全く行われていなかった。

そこで、近年終了した赤痢アメーバのゲノムデータベースを基に、コレステロールの合成、外界からの取り込み、代謝に関する遺伝子群の探索をすることをはじめとし、現行の実験室においてのコレステ

ロール要求性を新たに作成した培養系で確認し、最終的に赤痢アメーバの病原性にとってコレステロールがどのような役割を果たすのかを生化学的に解析した。

### B. 研究方法

#### a. ゲノム情報による赤痢アメーバのコレステロール生合成ならびに代謝関連遺伝子の探索

ヒトではコレステロールは細胞外から LDL リセプターを介するエンドサイトーシスによって取り込まれる共に、小胞体で *de novo* に合成されることが分かっている。この *de novo* の合成ならびに外界からのサルベージ経路に関する遺伝子群を、近年終了した赤痢アメーバのゲノムデータベース TIGR (<http://www.tigr.org>) の情報を基に、他種生物で報告されている遺伝子情報を prey とし、blastp アルゴリズムを用いて探索した。

#### b. コレステロール依存的な *in vitro* 培養系の確立

コレステロールが赤痢アメーバの細胞培養に必要であることは以前、海外のグループによって別の臨床単離株を用いて報告されていた。しかしながら用いた培養系が現行の純粋培養ではなく細菌共生の培養系であったこと、株間の違いによって発現する遺伝子に違いがあることが近年の DNA マイクロアレイの技術によって明らかにされている。そこで、現在世界的に広く用いられている実験室株

(HM1:IMSS cl6) がコレステロール依存的に培養が可能であるかを検討した。現行の純培養では BIS-33 培地 (BI 基礎培地、15%ウシ成牛血清、2% ビタミン混合液) を使用している。15%成牛血清に代えてウシ胎児血清を用い、添加するコレステロールには cholesterol/ lipoprotein 混合液 (Sigma 社) を使用した。培地中のコレステロール量は AmplexRed cholesterol assay kit (Molecular Probe 社) を用いて定量した。細胞の生育は 98 ウエルタイタープレートに  $5 \times 10^3$  cell/ウエルに播種し、1 ならびに 2 日後の細胞の増殖数を WST 試薬の吸収 (415/655) で測定した。

### c. 赤痢アメーバの病原性におけるコレステロールの役割

#### 1) CHO 細胞への障害性

CHO 細胞を 24 ウエルタイタープレートの底面に 80% confluent になるよう培養し、40  $\mu$ M CellTracker blue (Molecular Probe 社) で 2 時間ラベルした。その後、細胞を PBS で洗浄し、培地を加えて 2 時間培養した。1.5  $\times 10^5$  個の赤痢アメーバを 300  $\mu$ l の Opti-MEM 培地 (Invitrogen-Gibco、137 mM L-システイン、19 mM アスコルビン酸、pH 6.8) に懸濁し、CHO 細胞を培養したウエルに添加した。37°C で 1 時間培養した後、細胞を PBS (100 mM グルコース、100 mM ガラクトース、4°C) で洗浄し、底面に残った CHO 細胞は 200  $\mu$ l 0.05% トリプシン処理で回収した。CHO 細胞中の蛍光は 353 nm の励起波長と 465 nm の吸収波長で測定した。

#### 2) システインプロテアーゼ (CP) 活性におけるコレステロールの役割

CP 酵素は 1  $\mu$ g タンパク量のアメーバライゼートを使用した。このライゼートに 80  $\mu$ M の基質 ( $\alpha$ -Arg-Arg-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) を添加し、反応バッファー (0.1 M KHPO<sub>4</sub>, pH 6.1, 1 mM EDTA, 2 mM DTT) 下での発色を室温下で 400 nm の励起波長と 505 nm の吸収波長を測定した。

(倫理面への配慮)

バイオセーフティレベル 2 の赤痢アメーバを扱う

実験、組み換え DNA 実験、動物を用いた感染実験は申請者の研究組織における研究委員会で承認されている。

### C. 研究結果

#### a. 赤痢アメーバにおけるコレステロールのサルベージならびにコレステロール代謝関連遺伝子の同定

##### 1) *de novo* の系について

ヒトでは小胞体でアセチル CoA からメバロン酸が合成され、その後、炭素数 5 のイソペンテニルニリン酸 (IPP)、ジメチルアリルニリン酸 (DMAPP)、ファルネシルニリン酸 (FPP) が合成される。この FPP がステロール合成の出発点となる。この合成経路 (メバロン酸経路) に関わる合成酵素のうち、他種生物と相同性のあった赤痢アメーバ遺伝子は IPP から DMAPP を触媒するイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ (TIGR での ID 番号 46.m00229, *Pyrococcus* の酵素と同一性  $P = 2.5 \times 10^{-51}$ )、ならびに DMAPP から FPP を触媒するファルネシルニリン酸シンターゼ (68.m00243, 325.m00053,  $P = 0.0011$ ) が存在した。68.m00243 と 325.m00053 は 98% の同一性を示し、330 アミノ酸のうち 2 アミノ酸のみが変異していた。よって 68.m00243 と 325.m00053 の両者はアリルであると考えられた。さらに、68.m00243 は FPP からゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) を合成するゲラニルゲラニルニリン酸シンターゼにもファルネシルニリン酸シンターゼと同一の相同性を示した ( $P = 0.0011$ )。アミノ酸配列の比較からでは 68.m00243 が FPP シンターゼなのか GGPP シンターゼなのかを決定することは困難であった。

##### 2) *de novo* の合成を調節する転写因子について

細胞内のコレステロール合成遺伝子の転写は細胞内のコレステロールを小胞体で認識することによって調節されている。ヒトでは、細胞内のコレステロールが高いときには小胞体の膜タンパク質である SREBP は小胞体にとどまっているが、細胞内のコレステロールが低くなると SREBP は小胞体から形成される COPII 小胞に詰め込まれ、ゴルジ体へと輸送される。そこでゴルジ体に局在する SREBP 特異的プロテアーゼである Site-1、Site-2



プロテアーゼによって SREBP の細胞質ドメインは切断され、核内に輸送されてメバロン酸経路の酵素の転写を活性化させることが分かっている。この SREBP 経路に関与する一連の酵素 (SREBP、SREBP のアダプター Scap、Scap の小胞体アンカータンパク質 Insig、ゴルジ体膜タンパク質プロテアーゼ Site-1、Site-2) のホモログの探索をヒトの配列を prey に用い検索を行ったが、相当する遺伝子は赤痢アメーバゲノム上には発見できなかった。一方、SREBP をゴルジ体に輸送するための COPII 小胞を形成する因子は全て揃っており、小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送の機構自体は他種生物と同様に行われていると考えられた。

### 3) 非メバロン酸経路

寄生性原虫マラリアにはメバロン酸を介さずにピルビン酸から IPP を合成する系 (非メバロン酸経路) が色素胞の中に存在する。この非メバロン酸経路は高等植物や光合成を行う真正細菌 (*Synechocystis* sp、*Synechococcus leopoliensis*) だけでなく病原性の真正細菌 (*Escherichia coli*、*Haemophilus influenzae*、*Mycobacterium tuberculosis*) などにも存在する。高等植物シロイヌナズナと大腸菌の非メバロン酸経路に関与する 5 種の遺伝子 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP) synthase、DOXP reductoisomerase、4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol (CDP-ME) synthase、CDP-ME kinase、ME cyclodiphosphate synthase) を prey として用い、赤痢アメーバで相当する遺伝子を検索したが、赤痢アメーバには非メバロン酸経路に相当する遺伝子は発見できなかった。

### 4) サルベージ経路について

ヒトではコレステロールは外界から LDL と結合した形で、LDL リセプターを介して細胞膜からエンドサイトーシスによって取り込まれることが明らかとなっている。赤痢アメーバには LDL リセプターに相当する遺伝子は存在しない。しかしながら、蛍光色素である FITC-dextran が赤痢アメーバでエンドサイトーシスによって取り込まれること、細胞膜からのクラスリン被覆小胞の形成に関与する

クラスリン軽鎖ならびにアダプタータンパク質 AP2 がゲノムに存在することはエンドサイトーシスが活発に行われていることを示している。さらにヒトのコレステロール代謝異常遺伝病 (ニューマンピック症候群 C 型; NPC) の原因遺伝子 NPC1 の配列を prey にして、赤痢アメーバより EhNpc1 を単離した。EhNpc1 は全長で 1339 アミノ酸の長さを持つ膜タンパク質であり、ヒトでは後期エンドソームでリピッドパーメアーゼとしての機能を果たしていると報告されている。ヒトの NPC1 は 13 個の膜貫通ドメインを有するが、膜貫通ドメイン予測プログラム TMHMM v 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) の計算では、EhNpc1 は 17 回膜貫通ドメインを有することが分かった。全長の相同性はヒトと 37%、 $P = 6.1e^{-159}$  と高い相同性を示した。EhNpc1 の第 6 から第 8 膜貫通ドメインの周辺が sterol sense domain と考えられ、ヒト NPC1 と特に高い相似性を示した。EhNpc1 の 3' 末端の 200 残基を鋳型に用いて赤痢アメーバの cDNA から定量 PCR を行った結果、EhNpc1 遺伝子は確かに定常状態で発現していることを証明した。その発現量はコントロールに用いた RNA polymerase II 遺伝子とほぼ同等であった。

### 5) コレステロール代謝関連遺伝子

細胞内に取り込まれたコレステロールは 27 炭素数の酸化型であるオキシステロールに代謝され、オキシステロール結合タンパク質 (OSBP) と結合する。OSBP はその後、細胞内の様々なオルガネラに局在し、一方で核内に移行して転写調節に関与することがヒトや出芽酵母で報告されている。ヒトでは OSBP は 13 種、出芽酵母では 7 種の OSBP がコードされていることが分かっているが、赤痢アメーバでは 4 種の OSBP ホモログ (25.m00232、79.m00149、10.m00387、94.m00167) が存在することが分かった。どの遺伝子もヒトの OSBP と全長の相同性は 30%、 $P = e^{-21}$  以下と高い相同性を示した。4 種の EhOSBP は 2 種は短く、オキシステロール結合ドメインのみを有し、残りの 2 種は N 末端側にタンパク質間相互作用に必要なアンキリンリピート、C 末端側にオキシステロール結合ドメインと膜結合ドメインを有していた。アンキリンリピ

ートを有する膜結合型 OSBP の存在はヒトでは報告されていない。

さらにコレステロールやオキシステロールを結合するタンパク質として、steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START)ドメインファミリーが挙げられる。ヒトでは15種のSTARTドメインタンパク質の存在が報告されており、その基質もコレステロールやオキシステロールをはじめ、フォスファチジルコリン、セラミドなど多様である。赤痢アメーバゲノム中には7種のSTARTドメインタンパク質が存在することが分かった(99.m00180, 9.m00376, 119.m00116, 340.m00052, 57.m00164, 202.m00093, 128.m00132)。いずれもヒトのSTARTとP = 0.0017から $e^{-17}$ までの相同性を示す。赤痢アメーバのSTARTタンパク質は、ヒトの幾つかのSTARTがRhoGAPやPHドメインなどの融合型になっているのに対し、STARTドメインのみの200-300アミノ酸残基の短い遺伝子であった。

#### b. コレステロール依存的な *in vitro* 培養系の確立

現在世界で広く使用している BIS-33 培地 (BI基礎培地/2%ビタミン混合液/15%成牛血清、図1でABSと示す)のコレステロール濃度は150  $\mu\text{g cholesterol}/\mu\text{l}$ であった。哺乳類細胞の培養に用いるウシ胎児血清(図1、FCS)を15%加えたものは、コレステロール濃度は非常に低く、血清無添加のBI基礎培地(図1、-)と同等であった。つまり、以前より赤痢アメーバの培養にFCSでなくABSを用いるのは血清中にコレステロールが大量に含まれることが原因であった。次に、15%FCSを添加した培地にコレステロール懸濁液をさらに1%添加した培地を作成した(図1、FCS/cho)。この培地のコレステロール含量はBIS-33基礎培地の80%を占め、細胞の増殖も1日目はBIS-33と同様に生育し、2日目の細胞数はBIS-33の80%まで回復させた(図2)。一方で、血清を使用せず、1%コレステロールのみを添加した培地(図1、-/cho)では、培地中のコレステロール含量はFCS/choと同等ながらも、細胞増殖に於いて1日間はBIS-33培地と同等の細胞増殖を示したが、2日目には細胞は死滅した。以上のことから、赤痢アメーバの細胞増殖においてコレステロールが必須な因子である

こと、FCSをコレステロール欠損血清としてコレステロール依存的な細胞増殖の系を確立したこと、またコレステロールに加えてFCS中の他の脂質成分も生育に必要であることを明らかにした。また、BIS-33培地のコレステロール量をFCSで相補させるには5%のコレステロール懸濁液を添加することが必要であることが分かった。

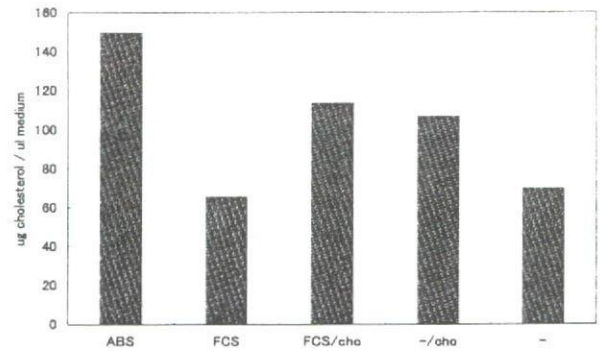


図1、実験に用いた培地のコレステロール濃度

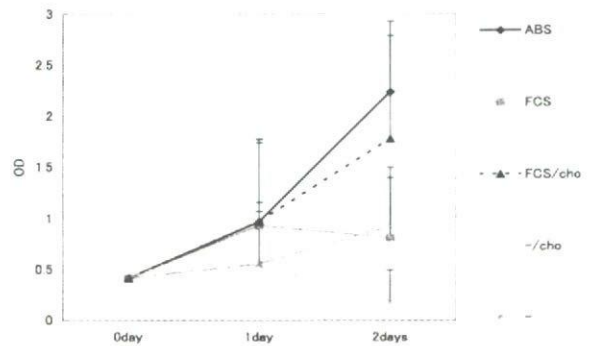


図2、コレステロール欠損培地での生育

#### c. 赤痢アメーバの病原性に於けるコレステロールの役割

##### 1) CHO細胞への障害性

CHO細胞障害実験にはアメーバを無血清培地であるOpti-MEMに懸濁させたときの細胞障害活性をコントロールとした。対数増殖後期の赤痢アメーバHM1:IMSS cl6株を1時間CHO細胞に接触させた時には73%のCHO細胞が赤痢アメーバによってプレート底面から除去された。そしてBIS-33培地に相当量の15%ABSをOpti-MEMに添加した際には、CHO細胞の除去効率は44%に低下した。つまりABS中には赤痢アメーバが病原因子として分泌するシステインプロテアーゼの阻害因子が存在することが予測された。さらに、15%ABSの代わりに、血清中のコレステロール量を相補するため

に5%コレステロールを添加したが、CHO細胞除去能は69%と、Opti-MEMのみの条件と同等であった。よって細胞外に多量のコレステロールを添加しても短時間の細胞障害活性には大きな影響がないことが判明した。

## 2) システインプロテアーゼ (CP) 活性におけるコレステロールの役割

CPは赤痢アメーバが細胞外に分泌する主要な細胞障害因子であるとともに、貪食によって取り込んだものをファゴソーム内で完了させる因子として非常に重要である。CHO障害実験には、CPの分泌量、CPと並ぶ病原因子であるアメーバポアの活性、CHO細胞の貪食能、赤痢アメーバの運動性など様々な要素を考慮することが必要なため、より直接的に細胞ライセート中のCP活性を測定した。反応液中に脂質成分を添加しないときのCP活性を100%とした場合、2.5%コレステロールを添加すると約2.2倍のCP活性の活性化が観察された(図3、2.5% cho)。コレステロールによるCP活性の活性化は低濃度で高く、0.05%–1%では4倍以上の活性化が見られたが、0.01%以下ではその効果は消失した(データは示さず)。さらにBIS-33培地中のコレステロール量を相補する5%コレステロール下では活性化効果は1.4倍と低下し(図3、5% cho)、さらに高濃度の10%–15%ではCP活性を抑制的に調節した。このようなCP活性化効果は純粋なコレステロールのみで有効であり、ABS添加下では観察されなかった(図3、5% ABS, 15% ABS)。また、コレステロールによるCPの活性化は赤痢アメーバのCPに特異的であり、哺乳類細胞のCHO細胞ライセートを使用した際にはこのような活性化作用は観察されなかった。

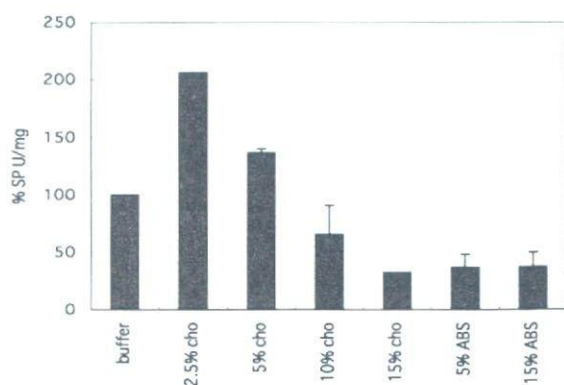


図3、コレステロールによるシステインプロテアーゼの活性化

## D. 考察

1980年代よりコレステロールの赤痢アメーバの病原性への関与については幾つか報告があったが、それらは細菌共生の polysenic 培養下での報告であり、より直接的にコレステロール特異的な効果を見極めることが必要であった。今年度の研究によって、赤痢アメーバはコレステロール合成系の遺伝子を全て欠き、もっぱら外界からのエンドサイトーシスによる取り込みに依存していることを明らかにした。

合成系の遺伝子に関しては哺乳類細胞をはじめ多くの生物に保存したメバロン酸経路ならびに高等植物や一部の細菌が有する非メバロン酸経路の遺伝子を欠失していた。メバロン酸経路において2つの遺伝子が赤痢アメーバに存在すると予測された。一つは *Pyrococcus* のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼであるが、*Pyrococcus* のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼはヒトのそのホモログと非常に低い相同性しか持ち合わせておらず、よって赤痢アメーバのイソペンテニルニリン酸イソメラーゼもヒトホモログとの相同性は低く、実際にヒト酵素と同様の活性を保持しているかどうかは不明である。二つ目はファルネシルニリン酸シターゼであるが、この酵素はコレステロール合成の出発点となる FPP を産生するとともに、FPP からタンパク質の脂質修飾の基質となる GGPP を産生するゲラニルゲラニルニリン酸シターゼにも同一の相同性を示した。赤痢アメーバではタンパク質修飾に関与するファルネシル転移酵素とゲラニルゲラニル転移酵素およびそのターゲットとなる GTP 結合タンパク質が既に同定されている。よって上記の2つの遺伝子はタンパク質の脂質修飾に関与し、コレステロール合成系のメバロン酸経路としての機能を持っていないと推測した。

メバロン酸経路の幾つかの遺伝子は細胞内のコレステロール濃度によって転写調節を受けることが報告されている。それら小胞体やゴルジ体に局在する転写調節関連タンパク質ホモログがゲノム情報から発見できなかったのも、メバロン酸経路の遺伝子が存在せずコレステロールによって調節を受

ける必要が無いことを示している。

一方で、外界からのサルベージならびに取り込んだコレステロールの代謝に関与する遺伝子を複数発見した。中でも EhNpc1 遺伝子は全長のアミノ酸配列がヒトホモログと高度に相似しており、実際にエンドソーム系でのリピッドパーミアーズとしての機能を持ち合わせていると考えられる。さらにヒトホモログとの間で sterol sense domain が特に相同性が高かったため、実際に sterol との結合ならびに認識に関与していると予測できた。現在、EhNpc1 を赤痢アメーバ内で発現させる系を作成しており、細胞内の脂質の挙動変化に付いて次年度以降解析していく予定である。コレステロール並びにその誘導体の結合に関与する OSBP や START ドメインを有するタンパク質群は赤痢アメーバに特異的なモチーフを有するものがあつた。これらにおいても、赤痢アメーバ特異的な脂質代謝経路に関与している可能性を見極め、解析を行う。近年では他種生物では OSBP や START ドメインはコレステロールだけでなくフォスファチジルコリン、セラミドなど他の脂質分子にも特異的に結合することが報告されている。赤痢アメーバの細胞内で一番多い脂質はフォスファチジルコリンであるが、次に多い脂質は赤痢アメーバ特異的な ceramide aminoethyl phosphonate である。セラミドはコレステロールとともに細胞膜の特殊なラフトというマイクロドメインを構成する主要な脂質であり、コレステロールだけでなく、その周辺で機能する脂質もアメーバの生育に重要だと考えている。

今回はじめて FCS をコレステロール欠損血清として使用し、コレステロール依存的に *in vitro* 培養する系を確立した。これによって、赤痢アメーバが確かにコレステロールを外界から取り込んで生育していることを証明できた。哺乳類細胞では、FCS からコレステロールを除去した血清 LPDS を使用することがあるが、赤痢アメーバが FCS で生育不可能なのは明らかに哺乳類細胞よりコレステロールの栄養要求性が高いからだと思われる。

最後にコレステロールの病原性に関する影響に付いて重要なことを発見した。赤痢アメーバは細胞内の多くの小胞（多くの場合はリソソーム）に CP を蓄積し、構成的に細胞外に分泌しながら宿主細胞の組織侵入を繰り返している。その活性化には適度

なコレステロール濃度が必要であることが明らかになった。CP と並ぶ主要な病原因子である膜穿孔活性ペプチドのアメーバポアはコレステロール依存的な活性化を示す。そしてアメーバポアが赤痢アメーバ自身の膜に対して穿孔活性を示さないのは、その活性調節を生体膜中のコレステロールが担っているからであることが報告されている。これと同様な現象が CP についても新たに確認できた。CP についてさらに興味深い点は、コレステロールが高濃度であると CP の活性抑制を示すことである。つまり赤痢アメーバのリソソームでは CP 活性は抑制されており、細胞外に分泌されて宿主細胞に結合すると宿主細胞膜内のコレステロールによって CP の活性化がおこるといふモデルが可能である。すなわち赤痢アメーバ自身の細胞に CP が作用しないために巧妙な活性調節経路を保持していることが考えられた。

## E. 結論

コレステロールは赤痢アメーバの生育にとって不可欠な因子であることを、近年のゲノムデータベースと新たに確立した培養系によって証明した。さらに主要な病原因子である CP がコレステロールによって濃度依存的に活性並びに抑制されており、赤痢アメーバの病原性にとってコレステロールが重要な鍵を握っていることが明らかとなった。よって、赤痢アメーバ特異的なコレステロール代謝系をさらに明らかにすることで、新規抗アメーバ症薬剤開発のための基盤を提供できると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Saito-Nakano, Y., Loftus, B.J., Hall, N., Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. **Exp. Parasitol.** 110:244-252.
2. Mitra, B.N., Yasuda, T., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T. (2005) Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the

non-pathogenic *Entamoeba dispar*. *Cell Motil. Cytoskeleton*. 62:84-99.

3. Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., Nozaki, T. (2005) A retromerlike complex is a novel Rab7 effector that is involved in the transport of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biol. Cell*. 16:5294-5303.

4 Mitra, B.N., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T. (2006) *Entamoeba histolytica*: Differences in phagosome acidification and degradation between attenuated and virulent. *Exp. Parasitol.* In press.

## 2. 学会発表

1. 中野由美子、津久井久美子、Biswa N. Mitra、岡田麻美、ぬで島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバのリソソーム形成における EhRab7 アイソタイプの解析 (2005) 第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.

2. 津久井久美子、中野由美子、Vahab Ali、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバの病原機構における Rab7A の役割 (2005) 第 74 回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.

3. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Mitra, B. N., Nakada-Tsukui, K., Kobayashi, S., and Nozaki, T. (2005) Role of Rab7 isotypes on virulence in *Entamoeba histolytica*. 第 58 回日本細胞生物学会大会 2005 年 6 月 15-17 日, 埼玉.

4. 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から観る赤痢アメーバの膜輸送 第 13 回分子寄生虫学ワークショップ 2005 年 8 月 1-4 日 トムラ

5. 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から観る赤痢アメーバの膜輸送の複雑さ 第 4 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005 年 11 月 5-6 日, 東京.

6. 津久井久美子、中野由美子、Vahab Ali、野崎智義 (2005) レトロマー複合体は赤痢アメーバ病原因子であるシステインプロテアーゼの輸送に関与している 第 4 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2005 年 11 月 5-6 日, 東京.

7. 中野由美子、Biswa N. Mitra、津久井久美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から見る赤痢アメーバのメンブレントラフィックと Rab7 アイソタイプの解析 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「メンブレントラフィックー分子機構から高次機能への展開」第 3 回全体班会議 2005 年 11 月 16-19 日, 草津.

8. Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Ali, V., and Nozaki, T. (2005) A retromer-like complex is a novel Rab7 effector that is involved in the sorting of the virulence factor cysteine protease in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. 文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「メンブレントラフィックー分子機構から高次機能への展開」第 3 回全体班会議 2005 年 11 月 16-19 日, 草津.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業  
若手研究者奨励研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団  
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社