

寄生虫感染と免疫応答

濱野真二郎*・吉田 裕樹**

寄生虫は真核生物であり、単細胞の原虫と多細胞の蠕虫に大別される。これら寄生虫による感染症は広く世界に蔓延するものの、罹患者の大部分が発展途上国に生きる貧しい人々であるために、顧みられることも少なく、多くの寄生虫疾患が『見捨てられた病気 Neglected Infectious Diseases』に分類される。その特徴は、長きにわたって人々の健康を損ない、その死亡率からは窺い知れないほど甚大な社会経済的な痛みと損失を生み出すことにある。われわれ人類は依然として『虫だらけの世界 Wormy World』に生きており、真核生物である寄生虫に対する既存の薬剤には、副作用や耐性病原体の出現など憂慮すべき点も多く、ワクチンや新規薬剤の開発が切望される。ワクチン開発のためには、各々の原虫・蠕虫に対する宿主の免疫応答や感染防御機構の理解が不可欠であり、本稿では寄生虫感染と免疫応答に関して、最新の知見を交えて概説したい。

はじめに

寄生虫は真核生物であり、単細胞の原虫 protozoa と多細胞の蠕虫 helminth に大別される。蠕虫はさらに線虫 nematode, 吸虫 trematode, 条虫 cestode に区分される。これら寄生虫によって引き起こされる感染症は、発展途上国の貧しい人々を中心に広く世界に蔓延しており、われわれが生きる世界は、21世紀になっても依然として『虫だらけの世界 Wormy World』なのである¹⁾。蚊によって媒介されるマラリアでは、アフリカの子供たちを中心に毎年、推計150~300万人の命が、赤痢アメーバ症では毎年およそ10万人の命が失われている。土壌媒介線虫の場合、蛔虫は8~12億人に、鉤虫は6~7億人に、鞭虫は6~8億人に感

染して住民の栄養を搾取している²⁾。かつて日本にも流行していた住血吸虫症には2億人が、蚊媒介性のリンパ系フィラリア症には1億2千万人が、ブユ媒介性のオンコセルカ症(河川盲目症)には3千7百万人が罹患していると推計され、マラリア同様に貧困にあえぐ人々の脅威となっている。これら寄生虫は生命の脅威となるばかりでなく、その多くは長期間ヒトに感染し、勤労意欲を失わせたり障害を残したりするため、甚大な社会経済的な痛みと損失を生み出し、地域や国が疲弊していく一因となる。そのような悪循環を断ち切るためにも、国際的な寄生虫対策が喫緊の課題となっている(表)。

国内に目を転じてみると、昭和20年前後の日本では、土壌伝播性の寄生虫(蛔虫・鉤虫など)が全

*Shinjiro HAMANO 長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学分野/教授
**Hiroki YOSHIDA 佐賀大学医学部生体機能制御学分野/教授

表 TDR(国連熱帯病研究訓練特別計画)の対象疾患である、10の疾患に関する資料

	DALYs(*) (万年)	死亡者数(万人)
アフリカ・トリパノソーマ(アフリカ睡眠病)	152.5	4.8
デング熱	61.6	1.9
リーシュマニア症	209.0	5.1
マラリア	4648.6	127.2
住血吸虫症	170.2	1.5
結核	3473.6	156.6
シャーガス病	66.7	1.4
ハンセン氏病	19.9	0.6
リンパ系フィラリア症	577.7	0
オンコセルカ症(河川盲目症)	48.4	0

*[World Health Report]ではDisease burden DALYsとなっている。DALYsは、“Disability Adjusted Life Years(the number of health years of life lost due to premature death and disability)”
DALYsは、日本国際保健医療学会によると、「疾病により失われた生命や生活の質を包括的に測定するための指標として『障害を考慮した生存年数』と訳されている。

*World Health Report 2004より

国的に蔓延しており、検便によると60~80%の人が何らかの寄生虫を保有していた。しかし高度成長後、日本ではこのような腸管寄生虫は激減した。この理由として、(1)農業における化学肥料の使用、(2)衛生知識の普及、(3)下水道普及などによる屎尿処理法の改善、などが挙げられる。他方、魚類、獣肉などの生食による寄生虫感染は依然として発生しており、グルメ時代を反映してむしろ増加傾向にある。また近年の国際化に伴い、マラリアなどの輸入感染症や、AIDS患者など易感染性宿主の増加を反映した寄生虫の日見感染症が増加しており、迅速かつ適切な診断と治療が求められている³⁾。

かつて、本邦には日本住血吸虫症という風土病があった。皮膚炎から始まり、重症化すると肝硬変などを引き起こし死に至らしめる場合もある。1913年に九州帝国大学の宮入慶之助博士らが世界に先駆けてこの生活環を解明し、その後の住血吸虫症防圧の端緒となった。住血吸虫は、幼虫の一形態であるセルカリアが水中でヒトの皮膚を破って侵入し、人体門脈内で成虫となり、有性生殖をして卵を生む。この卵が便とともに排泄されると、水中で孵化してミラシジウムとなるが、虫卵が肝

臓まで達すると肝炎を引き起こし、重症化すると肝硬変を主体とした病態を呈する。水中を遊泳するミラシジウムはミヤイリガイの中に入り、貝の中で幼生生殖を繰り返して、数千のセルカリアを生み出す。このように、ヒトという終宿主だけでは住血吸虫の一生は成り立たず、必ず中間宿主を必要とする。日本は戦後、ミヤイリガイの生息する水路や河原を人工的に改変し、徹底的にミヤイリガイを駆除することによって、住血吸虫症を終息させた⁴⁾。しかし、このような対策は、発展途上国や広大な大陸では実現困難であり、プラジカンテルという住血吸虫に対する特効薬が出現した現在でも、世界は相変わらず住血吸虫症による重荷に喘いでいる。

前述したように、寄生虫感染は中間宿主やベクターを介して伝搬するものが多く、それら中間宿主やベクターは、寄生虫防圧プログラムを遂行する際の格好の標的である。しかしながら、環境問題、薬剤耐性ベクターの出現、費用対効果などを考慮すれば、流行域に住む人々をターゲットにした感染予防、集団治療は非常に重要な方策である。寄生虫はヒトと同じ真核生物であり、原核生物である細菌を標的にした抗生物質は通常無効であ

る。また寄生虫に対する既存の薬剤には、薬剤耐性病原体の出現や重篤な副作用など憂慮すべき点も多い。イベルメクチン ivermectin は、北里大学名誉教授である大村智博士が見いだした放線菌由来の抗生物質を改良したものであり、オンコセルカ症、糞線虫症に著効するのみならず、犬フィラリアや外部寄生虫である疥癬に対する特効薬として世界中で重宝されている。かつて日本はバンクロフト糸状虫によるリンパ系フィラリア症の浸淫地であったが、ジエチルカルバマジン(diethyl-carbamazin; DEC)という薬剤を用いた集団治療で同症の制圧に成功した。その成功経験は、WHOを中心としたリンパ系フィラリア症ならびにオンコセルカ症の撲滅計画(Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis)に反映されており、本計画においてイベルメクチンが重要な役割を果たしている。一方、新規薬剤や有効なワクチンの開発を目指した挑戦も、粘り強く継続されている。東京大学の北潔教授らは、アスコフラノンがアフリカ睡眠病やナガナ病の病原体であるトリパノソーマ(原虫)に著効することを見出し、その実用化に向けて、さらなる研究を推し進めている⁵⁾。一方、寄生虫に対する感染防御機構の研究も根気強く続けられており、近年著しい進展が認められるために、本稿では寄生虫感染と免疫応答に関する新知見を含めて概説したい。

I. 寄生虫の感染経路

寄生虫は経皮的もしくは経口的に宿主に感染する。経皮的に感染する場合は、ベクター媒介性の感染も含め、感染の場である皮膚でいきなり宿主と寄生虫のせめぎ合いが始まる。体液中に存在する補体やリゾチームなどの生理活性物質もしくは好中球やマクロファージに感受性の高い微生物は、病原体とはなりにくい。言い換えると、経皮感染する寄生虫は、そのような生体防御バリアをやすやすと乗り越えることができる病原体である。一方、経口感染する寄生虫は、胃酸などの消化酵素に抵抗性を示す必要がある。蠕虫では幼虫包蔵卵、嚢虫、プレロセルコイド、メタセルカリ

アなどの形態によって、原虫では嚢子 cyst やオシスト oocyst といった形態をとることによって胃を通過することが可能となる。小腸に到着すると、孵化・脱囊・脱皮などを行い、目的とする寄生臓器を目指す。寄生虫がいったん組織に侵入すると、経皮感染した場合と同様に宿主とのせめぎ合いが始まる。

II. 寄生虫に対する自然免疫応答

自然免疫は、宿主の樹状細胞上にあるパターン認識受容体(Pattern recognition receptors; PRRs)が、微生物由来の病原体関連分子パターン(Pathogen associated molecular patterns; PAMPs)を認識することによって惹起される。その後、樹状細胞から炎症性サイトカインが産生されるとともに、樹状細胞上の共刺激分子の発現が上昇し、これらがリンパ球の活性化・分化を誘導し、引き続き獲得免疫応答をコントロールする。*Leishmania major* の lipophosphoglycan (LPG) や *Trypanosoma cruzi* の glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーは TLR2 によって、*Plasmodium falciparum* や *Toxoplasma gondii* の GPI アンカーや glycoinositolphospholipid (GPIs) は、TLR2 や TLR4 によって認識される。*T. cruzi* や *Trypanosoma brucei* の非メチル化 CpG モチーフ並びに *P. falciparum* 感染赤血球で産生されるヘモゾインは、TLR9 によって認識される。また、*T. gondii* の profilin 様タンパクは、TLR11 によって認識されると報告されている⁶⁾。上述のように、Toll 様受容体(Toll like receptors; TLRs)は代表的な PRRs であり、TLR3 を除く全ての TLRs からのシグナル伝達には、細胞内アダプター分子 MyD88 が不可欠である。

宿主と寄生虫が出会った場合に発動される宿主の自然免疫応答は、組織に侵入した寄生虫が、原虫であるか蠕虫であるかによって大きく異なる。MyD88 を遺伝的に欠損した宿主は、ほとんど全ての原虫に対する感染防御能が低下する。つまり、樹状細胞上にある TLRs によって原虫由来の PAMPs を認識して自然免疫を惹起することが、

原虫に対する感染防御にとって重要である。上述したように、これら自然免疫による感染防御は、リンパ球による適切な獲得免疫を誘導して初めて有効に機能する。AIDS患者などCD4陽性T細胞が十分に機能しない状態で、トキソプラズマやクリプトスポリジウムの日和見感染が多発するのは、期せずしてこれら原虫に対する感染防御におけるリンパ球の重要性を示している。

一方、蠕虫由来の分子は、一般的に樹状細胞上に存在するTLRsを含むPRRsを刺激することがなく、誘導されてくる獲得免疫の質が全く異なる。本年、ナチュラルヘルパー細胞と呼ばれるリンパ球が見出され、蠕虫感染における自然免疫応答に重要な役割を果たすことが報告されたので後述したい⁷⁾。

Ⅲ. 寄生虫に対する獲得免疫応答

寄生虫を含む病原体に対する防御免疫には、さまざまな要素が関与するが、そのなかでも特にCD4陽性ヘルパーT細胞(Th)が重要な役割を果たす。抗原に未曝露のナイーブCD4陽性細胞が、樹状細胞などの抗原提示細胞(antigen presenting cells; APCs)上の主要組織適合抗原(major histocompatibility complex; MHC)上に提示される病原体由来ペプチドを認識し活性化すると、Th1およびTh2という二つの異なる性格を持つ細胞群に分化していく。寄生虫感染の観点からは、Th1細胞がインターフェロン(IFN- γ)を産生することにより、マクロファージなどの食細胞を活性化し、細胞内寄生性原虫の排除に関与する一方で、Th2細胞はインターロイキン(IL-)4や13などのサイトカインを産生することにより、杯細胞や粘膜肥満細胞の分化や増殖を誘導し、杯細胞から産生されるムチンや粘膜肥満細胞からのケミカルメディエーターの放出は、腸内に寄生する蠕虫の排除に関わる。IL-4はB細胞(形質細胞)による抗体産生やそのクラススイッチを制御してIgEの産生を誘導し、Th2サイトカインの1つであるIL-5は好酸球を誘導する。近年になってTh1/Th2と性質を異にする新規ヘルパーT細胞集団、制御性T細

胞(regulatory T cells; Treg)とTh17が同定された。Tregは過剰な炎症が惹起されないように免疫制御に機能する細胞集団であり、Th17は、炎症誘導に関わるIL-17を産生し、好中球の遊走を介して細胞外病原体の排除に関与することが報告されている。

Ⅳ. 原虫に対する感染防御機構

マラリア malaria, トリパノソーマ類によるアフリカ睡眠病 sleeping sickness や、シャーガス病 chagas' disease, リーシュマニア類による内臓/皮膚/皮膚粘膜型リーシュマニア症 leishmaniasis, アメーバ赤痢 amoebiasis, ジアルジア症 giardiasis などが、原虫により引き起こされる代表的な熱帯感染症として知られている。また、トキソプラズマ症 toxoplasmosis やクリプトスポリジウム症 cryptosporidiosis は、免疫不全患者における日和見感染症として重要である一方、それぞれ先天性感染や水系集団感染を引き起こす病原体としても重要である。

マラリアの原因であるマラリア原虫 *Plasmodium* spp.は蚊媒介性の原虫であり、蚊によって注入されたスポロゾイトは肝臓で無性生殖を行い、血液中にメロゾイトとして放出される。メロゾイトは赤血球に寄生・増殖しつつ、多様な戦略によって宿主の免疫系から巧みに逃れる。各種リーシュマニア症の原因である *Leishmania* spp.はサンショウバエによって媒介される原虫であり、貪食したマクロファージをすみかとしてファゴライソゾームの中でぬくぬくと増殖する。シャーガス病の病原体であり、サシガメによって媒介される。 *T. cruzi* やトキソプラズマ症の病原体である *T. gondii* はほとんど全ての有核細胞に感染する。 *T. cruzi* はファゴゾームから細胞質に脱出して増殖し、 *T. gondii* はファゴゾームとライソゾームの融合を阻害してファゴゾームの中で増殖する。またクリプトスポリジウム症を引き起こす *Cryptosporidium* spp.は、腸上皮細胞の中で増殖する。上述の細胞内寄生性原虫は、食細胞などに貪食されたのち、その殺菌機構をかいくぐって食

細胞内で増殖し、病原性の発揮につながる。このように、宿主細胞内に寄生し免疫系から巧みに身を隠す原虫に対する感染防御には、自然免疫に引き続きTh1タイプの獲得免疫応答が誘導されることが重要である⁶⁾。ジアルジア症の病原体である *Giardia intestinalis*、アメーバ赤痢の病原体である *Entamoeba histolytica* は各々ヒトの大腸、小腸の管腔内で栄養体として増殖する細胞外寄生原虫であるが、近年、これら原虫に対する感染防御においても、Th1タイプの獲得免疫が重要であることが示唆されている。

抗原に未曝露のナイーブCD4陽性細胞は、Th1とTh2という異なる性質を持つ二つの細胞集団に分かれることが報告されたのち、その分化機構や生理的役割の詳細が明らかにされてきた。樹状細胞がその細胞膜上に発現するTLRsによって、原虫由来のPAMPsを認識すると、IL-12をはじめとした炎症性サイトカインの産生が誘導される⁶⁾。IL-12はナチュラルキラー(natural killer; NK)細胞やCD4陽性およびCD8陽性T細胞によるIFN- γ 産生を誘導し、さらにTh1細胞群の誘導・維持に重要な役割を果たす。IL-12刺激によりTh1細胞などから産生されるIFN- γ は、マクロファージなどに作用して、MHC分子の発現上昇などを介してその抗原提示能を亢進させるほか、誘導性一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase; iNOS)の発現を亢進させ、産生される一酸化窒素の作用などにより、さまざまな細胞内寄生性病原体の排除に関わっている。こうしたT細胞の分化には、サイトカインが重要な役割を果たしており、Th1への分化にはIL-12が必須の役割を担っている。近年、IL-12と類似性を持つサイトカインIL-23、IL-27、およびIL-35が相次いで同定され、IL-12がサイトカインファミリーをなすことが明らかになった。IL-12ファミリーサイトカインは、いずれもTh1分化を誘導する作用を持つ一方で、一部は免疫抑制作用を持つことが明らかになってきた⁸⁾。

前述のように、IL-12はNK細胞やTh1細胞によるIFN- γ の産生や、CD8陽性T細胞の活性化を誘導し、IFN- γ によるマクロファージの活性化は細

胞内寄生性原虫の排除に働く。マクロファージに寄生し、そのファゴライソゾームの中で増殖する *Leishmania* 原虫の排除には、このIFN- γ が決定的な役割を果たす。筆者らは、*L. major* 感染早期のTh1分化誘導において、IL-12に先駆けてIL-12ファミリーに属するIL-27/WSX-1が重要な役割を果たすことを示した⁹⁾。また、*Leishmania* 原虫に対する感染防御においては、IL-12に加えてIL-23も防御的に働くことが示されている。IL-12の重要性は、マクロファージに選択的に寄生する *Leishmania* 原虫に対してだけでなく、多様な細胞に感染する *T. cruzi* や *T. gondii* の感染においても示された⁸⁾。近年、IL-23は、IL-17やIL-22を産生するTh17細胞の増殖因子であることが判明した。IL-17は *T. gondii* 感染においては好中球の遊走を通して、*T. cruzi* 感染においては炎症性サイトカイン産生増強を通して、感染防御に貢献することが報告された¹⁰⁾。感染時にTh1細胞などによって産生されるIFN- γ は、宿主にとって諸刃の剣であり、病原体を排除するとともに自らに致命的な炎症を引き起こしうる。免疫制御性サイトカインIL-10、TGF- β ならびにIL-27は、炎症性サイトカインの産生抑制を通して、*T. cruzi* や *T. gondii* 感染における過剰な炎症の制御、ひいては生体防御に機能している^{11, 12)}。アフリカ睡眠病やナガナ病を引き起こす住血原虫 *Trypanosoma brucei rhodesiense*、*T. b. brucei* や *T. evansi* に対しても、IL-12は、IFN- γ の産生誘導を介して感染防御に機能している。マラリアの場合、マラリア原虫は肝細胞の中で増殖する赤外型と、赤血球の中で増殖する赤内型をとりうるが、いずれの場合もIL-12が、IFN- γ の産生誘導を介して感染防御に機能する。ただし、前述のように、マラリアにおいてIL-12/IFN- γ は、原虫排除のみならず自己の組織破壊をもたらすこともあり、*Plasmodium berghei* ANKAによって引き起こされる脳炎や、*P. berghei* NK65による肝炎は、IL-12/IFN- γ によって引き起こされることが知られている。*C. parvum* は腸管上皮細胞に感染する細胞内寄生原虫であり、小児や免疫不全状態にある人に下痢を引き起こす日和見病原体である。この

Cryptosporidium に対する感染防御機構の詳細は、未だ十分には理解されていないものの、IL-12, IFN- γ の重要性については繰り返し報告されている。また、腸管に寄生する細胞外寄生原虫である赤痢アメーバ *E. histolytica* に対する感染防御においても、IFN- γ が防御的に働くことが報告されている。

CD4陽性T細胞に加えて、NK細胞、CD8陽性T細胞や抗体が、効果的に機能する場合も知られている。ほとんど全ての有核細胞に感染する *T. cruzi* や *T. gondii* に対してはNK細胞、CD8陽性T細胞が防御的に働く。肝細胞で増殖する赤外期のマラリア原虫に対してはCD8陽性T細胞が機能し、赤血球に寄生している赤内期マラリア原虫に対しては抗体が有効である。アフリカ睡眠病やナガナ病を引き起こす住血原虫 *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei* や *T. evansi* に対しても抗体が効果的であるが、マラリア原虫もトリパノソーマも、遺伝子上に変異に富む表面抗原を多数コードしているために、抗体による防御はなかなかうまく機能しない。赤痢アメーバの糖鎖認識レクチンに対するIgAは、赤痢アメーバの腸管内定着を阻害すると考えられている。

V. 蠕虫に対する免疫応答と感染防御機構

蠕虫が経皮もしくは経口感染すると、蠕虫は目的臓器を目指して体内を移行する。蠕虫に感染すると宿主はしばしばTh2反応を惹起するが、蠕虫感染においてTh2反応が誘導される機序の詳細は、未だに解明されていない。原虫や細菌、ウイルスと違って蠕虫由来の抗原はPAMPsに乏しく、Th1タイプの獲得免疫を誘導する炎症性サイトカインIL-12の産生誘導が低いことが要因かもしれない。蛔虫、鉤虫、糞線虫や糸状虫など、幼虫が体内を移行する蠕虫感染では、幼虫の分泌(excretory-secretory; ES)抗原に対してTh2反応が誘導されるし、住血吸虫の感染では同吸虫の虫卵抗原に対してTh2の免疫応答が誘導される。蠕虫には、Th1タイプの獲得免疫を誘導するPAMPsが乏しいばかりではなく、住血吸虫卵か

ら分泌される糖タンパク質 omega-1 のように強力なTh2誘導活性を示す分子を有するのかもしれない¹³⁾。蠕虫の体表を覆うchitinにもTh2誘導活性があることが知られている¹⁴⁾。いずれにしても、Th2反応が誘導されることは蠕虫感染に比較的通じた現象であり、IL-4依存性の高IgE血症や、IL-5依存性の好酸球増多は蠕虫感染を示す臨床所見の1つである。Th2応答の誘導・増強に機能する細胞集団として好塩基球が目ざされていたが¹⁵⁾、本年、fat-associated lymphoid cluster (FALC) が新たに同定・報告された。FALCに存在するc-kit⁺Sca-1⁺細胞は蠕虫感染やIL-33に反応して、大量のTh2サイトカインを産生する新規のnon-T non-Bリンパ球であり、ナチュラルヘルパー細胞と命名された⁸⁾。このc-kit⁺Sca-1⁺細胞の病態生理における役割の解明は、蠕虫感染のみならずアレルギー疾患などTh2応答によって特徴付けられる病態の理解を、より一層深めると期待される。

VI. 寄生虫感染における制御性T細胞の役割

寄生虫は宿主の防御免疫からのエスケープ機構を有する。その中には感染細胞や自然免疫系細胞に免疫抑制性サイトカインであるIL-10や、TGF- β の産生を誘導する場合や、Tregなど制御性細胞群を誘導して免疫抑制に働く場合など、過剰な炎症を抑制する免疫制御機構を逆手にとるものがある⁹⁾。近年、寄生虫感染におけるTregの役割が解明されてきた。ネズミマラリア原虫 *Plasmodium yoelii* XL株(致死株)の感染において、Tregを除去すると免疫抑制が解除され、宿主は原虫を排除して生存することができる¹⁶⁾。またヒトの糸状虫 *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* によって引き起こされるフィラリア症では、Tregによって宿主の免疫応答が著しく抑制されるなど、ある条件下ではTregによる免疫制御が感染防御の阻害に繋がることが示された。一方、マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* 感染動物では、制御性T細胞を除去すると肝障害が亢進するなど、このTregによる制御機構が十分に機能しない場合、過剰な免疫応答が自己組織のダメージへと繋がる

ことが報告されている。制御性T細胞の機能を人為的に操作し、治療へ応用することで、これらの問題を克服することが可能となるかもしれない。

おわりに

Th1/Th2という性質の異なるヘルパーT細胞サブセットの発見、およびTh1分化を誘導するIL-12の発見により、細胞内寄生性病原体に対する防御免疫におけるTh1/IL-12/IFN- γ の重要性が広く認識されてきた。また、近年IL-12関連サイトカインが相次いで同定され、さらにTh17やTregなどの新しいCD4陽性細胞サブセットが同定されたことで、ヘルパーT細胞の分化と免疫制御におけるその役割の理解は、新しい局面を迎えている。一方、FALCとFALCに存在するナチュラルヘルパー細胞(c-kit⁺Sca-1⁺細胞)が蠕虫感染におけるTh2応答に果たす役割が明らかになることに伴い、蠕虫をはじめとした寄生虫に対する免疫応答の研究も、大きく展開することが期待される。

参考文献

- 1) Stoll NR : This wormy world. J Parasitol 1947 ; 33 : 1~18.
- 2) Bethony J, et al. : Soil-transmitted helminth infections : ascariasis, trichuriasis, and hookworm. Lancet 2006 ; 367 : 1521~1532.
- 3) 濱野真二郎 : 寄生虫による病気 家庭の医学 第6版. 2008 ; 1523~1535.
- 4) 宮入慶之助記念誌編纂委員会編 : 住血吸虫症と宮入慶之助 —ミヤイリガイ発見から90年—. 九州大学出版会, 2005 ; 1~290.
- 5) 山内一也, 北 潔 : 〈眠り病〉は眠らない—日本発! アフリカを救う新薬. 岩波書店, 2008 ; 1~128.
- 6) Gazzinelli RT, Denkers EY : Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways : implications for host parasitism. Nat Rev Immunol 2006 ; 6 : 895~906.
- 7) Moro K, et al. : Innate production of Th2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit⁺Sca-1⁺ lymphoid cells. Nature 2010 ; 463 : 540~544.
- 8) 吉田裕樹, 濱野真二郎 : 原虫感染とIL-12サイトカインファミリー. 蛋白質 核酸 酵素 ; 2009 ; 54 : 1059~1065.
- 9) Yoshida H, et al. : WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. Immunity 2001 ; 15 : 569~578.
- 10) Miyazaki Y, et al. : IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol 2010 ; 185 : 1150~1157.
- 11) Hamano S, et al. : WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. Immunity 2003 ; 19 : 657~667.
- 12) 小林隆志 ほか : 感染症制御における制御性T細胞. アレルギー・免疫 2009 ; 16 : 708~714.
- 13) Steinfeld S, et al. : The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). J Exp Med 2009 ; 206 : 1681~1690.
- 14) Reese TA, et al. : Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. Nature 2007 ; 447 : 92~96.
- 15) Yoshimoto T, et al. : Basophils contribute to Th2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4⁺ T cells. Nat Immunol 2009 ; 10 : 706~712.
- 16) Hisaeda H : Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. Nat Med 2004 ; 10 : 29~30.



トキソプラズマ、増殖の 仕組み

◆キーワード

トキソプラズマ
細胞内寄生
内生2分裂
植物ホルモン
アブシジン酸

国立感染症研究所寄生動物部 *主任研究官

青沼 宏佳 (あおぬまひろか)

田原美智留 (たはらみちる)

* 永宗喜三郎 (ながむねきさぶろう)

はじめに

トキソプラズマ原虫は非常に popular な病原微生物である。日本では人口の20〜30%、フランスでは80%以上の人が感染していると言われている。多くの感染者にとって、トキソプラズマ感染は不顕性に経過するが、一方でトキソプラズマ感染症は一度発症すると非常に重篤な感染症となる。

また、トキソプラズマはすべての温血動物(哺乳類および鳥類)のすべての有核細胞に感染能を持っていると言われている。そして

多くの場合、原虫は宿主に何ら症状を起こさず不顕性感染として宿主に一生寄生し続けることができる。本稿ではこのようなトキソプラズマのユニークな形質のうち、特に増殖に関わる最新の知見を紹介していきたい。

トキソプラズマの寄生 メカニズム

トキソプラズマ虫体の頂端(apical)には宿主細胞に侵入する際に機能する複雑(complex)な頂端複合物“apical complex”が存在する。apical complexには、マイクロネ

ーム、ロプトリール、デンス・グラニュールと呼ばれる分泌器官が開口しており、これらから分泌される分子は細胞侵入と細胞内生存のために重要な役割を果たしている。

寄生過程において、原虫はまず宿主細胞表面をグライディングと呼ばれる独特な機構により移動し、宿主細胞にその先端部を附着させる。マイクロネームから分泌されるタンパク質群は、細胞外原虫の宿主細胞への侵入に接着分子として役立っている(図1、左)。

宿主接着後、原虫は活発に宿主細胞膜を陥入しながら宿主細胞内

に入っていく(図1、中)。侵入自体は通常20秒以内で完了する。この侵入は、ウイルスや細菌などのような宿主によるエンドサイトーシスではなく、原虫由来のグライディング運動によるものである。また侵入時に原虫は、宿主との接点においてムービング・ジャンクションと呼ばれる構造を形成する。この部分において、原虫は未知のメカニズムにより宿主の膜タンパク質を選択的に排除することが知られている。そして最終的に、原虫は宿主内において寄生胞と呼ばれる特殊化された区画内に存在している状態となる(図1、右)。

デンス・グラニュールからのタンパク質分泌は、侵入中や侵入終了後に起こり、寄生胞内の修飾に関与していると考えられている。寄生胞内で増殖した原虫は、最終的に宿主細胞を破壊して脱出し、次の細胞へ再び侵入していく。

これらのトキソプラズマ由来の分泌タンパク質群のうち、ロプトリールから分泌されるタンパク質群は宿主細胞機能を修飾し、細胞内を原虫の生存に適した環境に改変

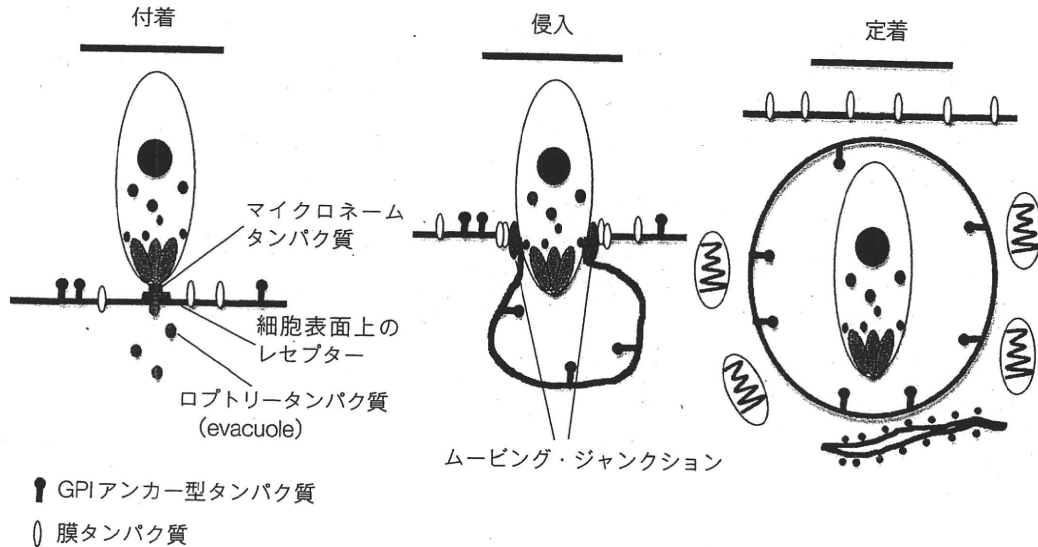


図1 トキソプラズマの細胞侵入機構

宿主細胞に付着した原虫はevacuoleとしてロプトリータンパク質を注入する。一方で原虫自身はマイクロネームタンパク質により細胞表面上のレセプターと結合し、侵入を開始する。

侵入中に原虫は宿主との接点にムービング・ジャンクションと呼ばれる構造を形成し、原虫はそこで寄生胞に取り込むべき宿主タンパク質と、排除すべきものを選別すると考えられている。原虫は宿主細胞侵入後も宿主細胞や寄生胞の修飾を続け、自身の周りを増殖に適した状態へと変えていく。

する能力を持つと言われており、非常にユニークな存在である。ロプトリータンパク質の分泌は、原虫の宿主侵入に先立ち、独立した小胞(evacuole)として原虫から宿主細胞に注入される。evacuole内のロプトリータンパク質のうちの一部は後に寄生胞膜に融合され、原虫—宿主間の相互作用に関与する。一方で、ロプトリータンパク質群の中には、寄生胞に輸送される以外に宿主の核に輸送される一群の存在が知られている。

これらのタンパク質群はキナーゼドメインを持っており、宿主のタンパク質をリン酸化すると考えられているが、その詳細は未だ不明である。また、これらのロプトリータンパク質のうち、ROP16やROP18はトキソプラズマの病原性を規定する因子であることが知られている¹⁾²⁾。

内生2分裂

トキソプラズマを含むアピコンプレクス門の原虫は、きわめて複雑で珍しい分裂様式を取る。それは、内生2分裂(endodyogeny)である。

ある。内生2分裂の最大の特徴は、「一つの細胞質の中に」娘細胞が二つ形成されるという点にあり、動物、植物、カビや細菌などに見られる一般的な2分裂とは大きく性質を異にしている³⁾。

トキソプラズマ(図2)の内生2分裂はゴルジ体の分裂で開始する。ゴルジ体は母細胞内で伸長し、まだ娘細胞の形が定まらないうちに二つに分裂する(図2b)。ゴルジ体の伸長と同時に、アピコンプレクス門原虫に独特の細胞内小器官であるアピコプラストも伸長するが、分裂はせず娘細胞の足場が形成される時を待つ(図2b)。また中心体は、ゴルジ体の分裂と同時に分裂し、その後アピコプラストの伸長と並行して、娘細胞が構築される予定位置へと移動することが知られている。

このような第一段階とも言える小器官分裂の後、ようやく娘細胞構築の骨組みの形成が行われる。後に娘細胞の細胞内小器官はこの骨組みに基づいて分配される。娘細胞形成の足場はinner-membrane complex (IMC) とインナー膜系

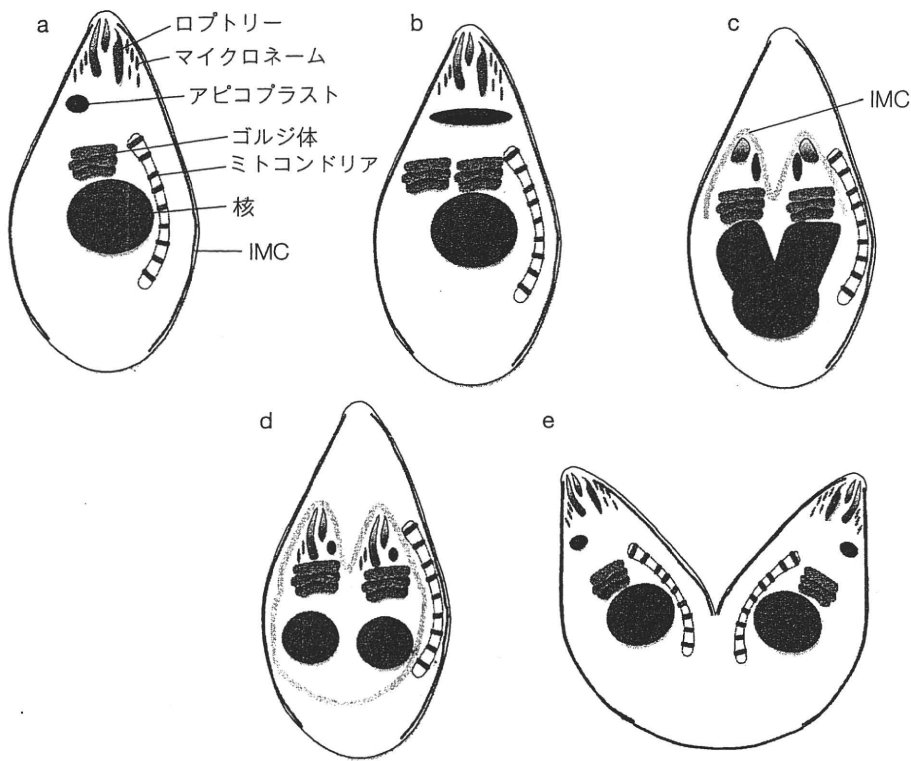


図2 トキソプラズマの内生2分裂

a: 間期. b: 分裂開始. アピコプラストが伸長し、ゴルジ体は分裂する. c: 娘細胞のIMCが形成され始め、アピコプラストが分裂、分配される. 親細胞の分泌器官であるロプトリーやマイクロネームは消失し、娘細胞の頂端部に新たに形成される. 核内DNAが複製され分配される. d: 親細胞内に2つの娘細胞が形成される. この段階になって初めてミトコンドリアの分配が始まる. e: 親細胞は融解、消失し、分裂が終了する.

であり、娘細胞の頂端部となる部分から順に母細胞内に構築されていく(図2c)。IMCによる足場の構築が始まると、アピコプラストの分裂が起こり、中心体とともに娘細胞に分配される(図2c)。

一方、核ではすでにDNAの複製が行われており、アピコプラストの分裂とほぼ同時に核が分裂することも明らかにされている。その際に哺乳動物をはじめとする多くの真核動物で見られるような核膜の消失や、紡錘体の形成による染色体の分配は行われず、核は核膜に包まれたまま娘細胞に分配される(図2c)。この時、小胞体も核膜に連合して核とともに娘細胞に分配される。

以上のように、細胞内小器官の多くは母細胞の小器官が分裂することによって娘細胞に分配されるが、娘細胞には新規に形成される小器官も存在する。それは、マイクロネームとロプトリーである(図2a)。これらの小器官は、娘細胞に新たに形成され、その形成と同時に母細胞の同小器官は消失する(図2c)。

そして、最後に娘細胞に分配される小器官がミトコンドリアである。トキソプラズマのミトコンドリアは、娘細胞の足場であるIMCが伸長し、他の小器官が娘細胞に分配されつつある間は娘細胞に分配されることなく、母細胞側から娘細胞を囲っている(図2d)。そして、娘細胞の分裂の完成と同時に娘細胞側に取り込まれて分配される(図2e)。この一連の経過を経て、一つの母細胞中に二つの娘細胞が形成され、内生2分裂は終結する。

このような内生2分裂について、

これまでに興味深い現象も示されてきた。例えば、真菌症の薬として知られるイトラコナゾールが、トキソプラズマの内生2分裂を阻害し、その増殖を抑制することが報告されている⁴⁾。イトラコナゾール処理したトキソプラズマでは、分裂異常から生じる形態異常が観察される。すなわち、母細胞中に形成された娘細胞の最終分離が正

確に行われず、二つの娘細胞が結合したままの形を取るののである。そして、結合したままの娘細胞中にさらに孫細胞が形成され、結合した四つの細胞が観察される。その後、細胞小器官の正しい分配が行われず原虫は死滅する。このような現象から、イトラコナゾールはトキソプラズマ治療薬としての効果も期待されている。

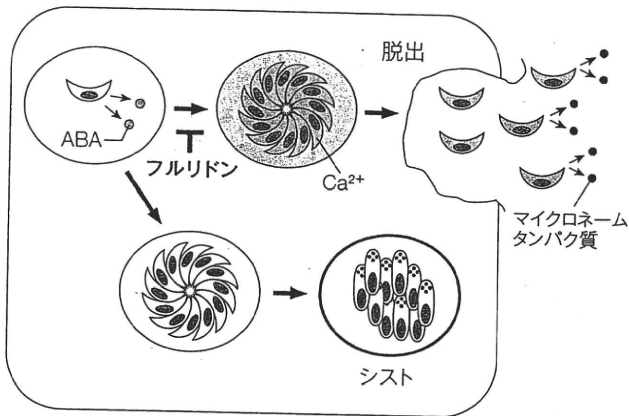


図3 植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) がトキソプラズマに及ぼす影響

ABAの蓄積が原虫細胞質内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、原虫は宿主細胞からの脱出やマイクロネームタンパク質の分泌を開始する。フルリドンはアブシジン酸の生合成を阻害し、原虫の脱出を抑制しシストへの分化を促進させる。

トキソプラズマとアブシジン酸 (ABA)

筆者らは最近、トキソプラズマが植物ホルモンの一種であるアブシジン酸 (ABA) を産生し、原虫はこのホルモンにより自身の増殖を調節していることを見出した⁵⁾。ABAは植物ではセカンドメッセンジャーである cyclic ADP-ribose (cADPR) の産生依存的に細胞質内へのカルシウム放出を引き起こすことが知られている。このABAをトキソプラズマ原虫に添加すると、原虫の運動や宿主細胞への侵入に重要な役割を持つ、マイクロネームタンパク質の分泌が誘導された。

また筆者らはすでに、マイクロネームタンパク質の分泌は cADPR 依存的な原虫細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることを見出していたので、実際に ABA 添加後に原虫の産生する cADPR を測定したところ、加えた ABA 量に依存して有意に上昇していた。また、この ABA によるマイクロネームタンパク質分泌は細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることが確認できた。

さらに筆者らは Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) や MS 解析により、トキソプラズマ原虫が実際に ABA を産生していることを証明した。ABA 濃度は、原虫が宿主細胞から脱出する直前に急激に上昇していた。MS/MS 解析により、トキソプラズマ原虫は trans 型および cis 型の両方の ABA を産生していることが示された。宿主細胞内の原虫に、外部から ABA を加えると、原虫の宿主細胞からの脱出が誘導された。

また、植物において ABA 生合成の特異的阻害薬であることが知られているフルリドンは、トキソプラズマ原虫においても ABA 産生を阻害した。そこで原虫の培養をフルリドン処理すると、トキソプラズマ原虫は加えたフルリドンの濃度依存的に宿主細胞からの脱出が阻害された。しかしながら、この阻害は外部からの ABA 添加によって相補できた。これらのことから ABA は原虫にとって、宿

主細胞からの脱出のシグナルになっている可能性が考えられた。

以上の結果から、トキソプラズマ原虫はA B Aを産生しており、A B Aは原虫内でカルシウム放出のセカンドメッセンジャーであるcADPR産生を誘導し、細胞質内カルシウム濃度を上昇させ、宿主細胞からの脱出やそれに伴うグライディングと次の宿主細胞への侵入を促進するという一連のシグナルの存在が示唆された(図3)。

また、A B A生合成阻害薬フルリドンの培養中への添加によりA B Aの生合成を阻害すると、原虫のシストへの分化が誘導された(図3)。

フルリドンは一方で、マウスを用いたトキソプラズマ感染実験において、マウスの致死率を有意に減少させた。このことは、A B A生合成の阻害が原虫の宿主細胞からの脱出を抑制することによる感染拡散の阻止の結果であると推定できた。この結果、フルリドンが哺乳動物に対し毒性が弱く、除草剤として用いられている事実と合わせて考えると、フルリドン、あ

るいはA B A生合成阻害薬が抗トキソプラズマ薬開発の良いリード化合物となる可能性を示唆する。

おわりに

以上の例から明らかのように、最近の分子生物学、細胞生物学の発展によりトキソプラズマの増殖機構の一端が明らかにされ、その独自の生物学に注目が集まりつつある。トキソプラズマはマラリアの原因となるマラリア原虫と同じアピコンプレクス門に分類され、共通の事象も多い。トキソプラズマはマラリア原虫と比べ、分子生物学的、細胞生物学的解析が容易であることから、マラリア原虫をはじめとする他のアピコンプレクス門原虫のモデルとしても注目されつつある。

□□□文 献□□□

- 1) Saeij JP, et al: Nature 445: 324, 2007. 2) Taylor S, et al: Science 314: 1776, 2006. 3) Nishi M, et al: J Cell Sci 121: 1559, 2008. 4) Martins-Duarte Edos S, et al: FEMS Microbiol Lett 282: 290, 2008. 5) Nagamune K, et al: Nature 451: 207, 2008.

トキソプラズマが産生する植物ホルモン

*国立感染症研究所 寄生動物部
永宗喜三郎

1. トキソプラズマ症

トキソプラズマ原虫はほとんどの温血動物の全ての有核細胞に感染能を持ち、全人類の1/3以上、日本人の約25~30%が感染しているといわれている非常に広く蔓延している寄生性原生生物である。多くの感染者にとって、トキソプラズマ感染は不顕性に経過するが、一方でトキソプラズマ感染症は一度発症すると非常に重篤な感染症となる。1999年アメリカCDCからの報告の中では、トキソプラズマ症は、food borne diseaseによる全入院患者のうち原因の明らかになったものの4.1% (第4位)、死者数においては20.7% (第3位)にもなると推定されている¹⁾。また、トキソプラズマ原虫はHIV感染者に致死的な脳炎を引き起こして患者を死に至らしめることが知られており、アメリカでの統計によるとHIV感染患者の18~25%がトキソプラズマ脳炎を発症することが報告されている²⁾。一方1999年WHOからの報告によると³⁾、1998年の全世界の総死者数の25%を占める感染症による死者のうち、17.3%がAIDSを原因として亡くなっていることと合わせて考えると、世界中の感染症による死者の約4%はトキソプラズマ感染症が原因で亡くなっていると思積もることも

可能である。

2. 植物としてのトキソプラズマ

トキソプラズマが属する、アピコンプレクス門に属する原虫には現在5,000種以上が知られており、全てが寄生性の原生動物である。この中にはマラリア原虫やトキソプラズマ、クリプトスポリジウムなど人類にとって大きな脅威となっている感染症が含まれている^{1,3)}。これらアピコンプレクス門に属する原虫の大きな特徴の1つとして、アピコプラストと呼ばれるオルガネラの存在が挙げられる。アピコプラストは葉緑体が退化してできた四重膜構造の細胞内小器官であり、通常の葉緑体は光合成細菌が植物の祖先に取り込まれて進化したものとされているが、アピコプラストは光合成細菌を取り込んだ紅藻類の祖先が原虫の祖先生物に取り込まれることによって成立したと考えられている(図1)。そのために、アピコプラストは独特の四重膜構造をとる。現在ではアピコプラストは光合成能を失ったものの、脂肪酸合成などの機能を今でも担っており、したがって原虫にとって必須のオルガネラである。しかしながらその機能の詳細は不明であり、何故原虫の生存に必須なのかもはっきりとはわかっていない。いずれにしても、アピコンプレクス

門原虫の細胞内には植物が「組み込まれている」ということは今やよく知られている事実となっている。

3. トキソプラズマとアブシジン酸

著者らは最近、トキソプラズマが植物ホルモンの一種であるアブシジン酸を産生し、原虫はこのホルモンにより自身の増殖を調節していることを見出した⁴⁾。アブシジン酸は高等植物ではセカンドメッセンジャーであるcyclic ADP-ribose (cADPR)の産生依存的に細胞質内へのカルシウム放出を引き起こすことが知られている。このアブシジン酸をトキソプラズマに添加すると、原虫の運動や宿主細胞への侵入に重要な役割を持つ、マイクロネームタンパク質の分泌が誘導された。著者らは既に、マイクロネームタンパク質の分泌はcADPR依存的な原虫細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることを見出していたので⁵⁾、実際にアブシジン酸添加後に原虫の産生するcADPRを測定したところ、加えたアブシジン酸量に依存して有意に上昇していた。また、このアブシジン酸によるマイクロネームタンパク質分泌は細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることが確認できた。

更に我々はELISAやMS解析により、トキソプラズマ原虫が実際に

*〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1
E-mail nagamune@nih.go.jp

アブシジン酸を産生していることを証明した。また、宿主細胞内の原虫に外部からアブシジン酸を加えると、原虫の宿主細胞からの脱出が誘導された。更に、植物においてアブシジン酸生合成の特異的阻害剤であることが知られているフルリドンは、トキソプラズマにおいてもアブシジン酸産生を阻害した。そこで原虫の培養をフルリドン処理すると、トキソプラズマは加えたフルリドンの濃度依存的に宿主細胞からの脱出が阻害された。またこの阻害は外部からのアブシジン酸添加によって相補できた。これらのことからアブシジン酸は原虫にとって、宿主細胞からの脱出のシグナルになっている可能性が考えられた。また、アブシジン酸生合成阻害剤フルリドンの培養中への添加によりアブシジン酸の生合成を阻害すると原虫のシストへの分化が誘導された。以上の結果から、トキソプラズマ原虫はアブシジン酸を産生しており、アブシジン酸は原虫内でカルシウム放出のセカンドメッセンジャーであるcADPR産生を誘導し、細胞質内カルシウム濃度を上昇させ、宿主細胞からの脱出やそれに伴う運動と次の宿主細胞への侵入を促進するという一連のシグナルの存在が示唆された(図2)。

フルリドンは一方で、マウスを用いたトキソプラズマ感染実験におい

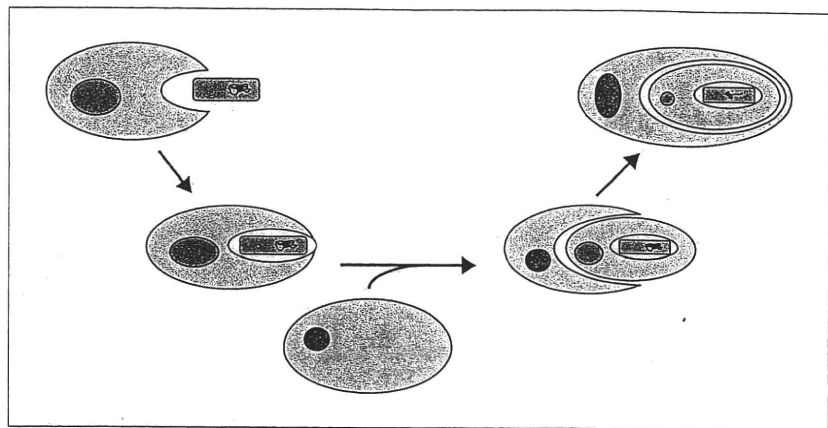


図1 アピコプラストの成立機序

通常の葉緑体は光合成細菌(緑)が植物の祖先(水色)に取り込まれて進化したものとされているが、アピコプラストは光合成細菌を取り込んだ紅藻類の祖先が原虫の祖先生物(赤)に取り込まれることによって成立したと考えられている。そのために、アピコプラストは独特の四重膜構造をとる。

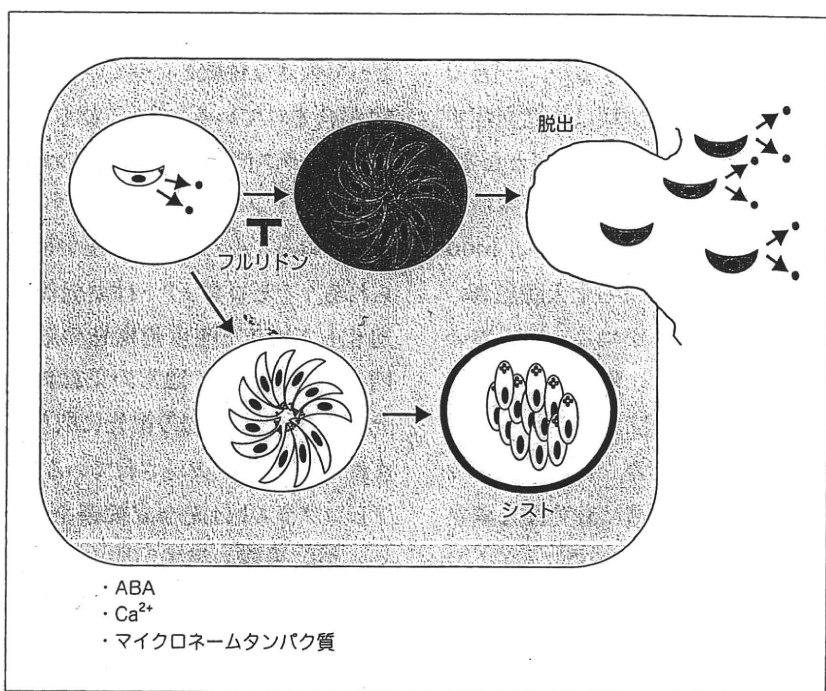


図2 植物ホルモンであるアブシジン酸がトキソプラズマ原虫に及ぼす影響

アブシジン酸(ピンク)の蓄積が原虫細胞質内カルシウム(青)濃度の上昇を引き起こし、原虫は宿主細胞からの脱出やマイクロネームタンパク質(緑)の分泌を開始する。フルリドンはアブシジン酸の生合成を阻害し、原虫の脱出を抑制しシストへの分化を促進させる。

て、マウスの致死率を有意に減少させた。この結果はフルリドンが哺乳動物に対し毒性が弱く、除草剤として用いられている事実と合わせて考えると、フルリドン、あるいはアブ

シジン酸生合成阻害剤は抗トキソプラズマ薬開発のいいリード化合物となる可能性が示唆された。

おわりに

マラリア原虫やトキソプラズマを初めとする、多くのアピコンプレクス門原虫はアピコプラストと呼ばれる紅藻由来の共生器官を持っていることから、これらアピコンプレクス門原虫は葉緑体由来の多くの代謝経路を未だ保持している可能性が考えられている。事実、アピコンプレクス門原虫はイソプレノイドを合成するための経路(メバロチン経路)を消失しており、そのためイソプレノイド合成は、植物と同じDOXP-MEP経路を持つアピコプラストに依存していることが知られている⁶⁾。高等植物において、アブシジン酸の生合成の多くのステップは葉緑体内で行われていることと、アブシジン酸生合成はイソプレノイドから β -カロチンを合成することによって開始されることから、おそらくトキソプラズマにおいてもアブシジン酸生合成の大部分はアピコプラストにおいて行われている可能性が示唆できる。また、アピコンプレクス門原虫において既に光合成能を失ったアピコプラストが未だ原虫の生存に必須であるという理由の1つに、今回見出されたアブシジン酸生合成経路の存在があるのかもしれない。

参 考 文 献

- 1) Mead PS, Slutsker L, Dietz V, *et al.* Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999 ; 5 : 607-25.
- 2) Kasper LH, Buzoni-Gatel D. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: candidiasis, pneumocystosis, cryptosporidiosis, toxoplasmosis. *Parasitol Today* 1998 ; 14 : 150-6.
- 3) WHO. World Health Organization Report on Infectious Diseases: Removing obstacles to healthy development 1999.
- 4) Nagamune K, Hicks LM, Fux B, *et al.* Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature* 2008 ; 451 : 207-10.
- 5) Chini E N, Nagamune K, Wetzel DM *et al.* Evidence that the cADPR signalling pathway controls calcium-mediated microneme secretion in *Toxoplasma gondii*. *Biochem J* 2005 ; 389 : 269-77.
- 6) Sibley LD. Intracellular parasite invasion strategies. *Science* 2004 ; 304 : 248-53.



Minireview

Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: Annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology

Kumiko Nakada-Tsukui, Yumiko Saito-Nakano, Afzal Husain, Tomoyoshi Nozaki *

Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2009
 Received in revised form 19 April 2010
 Accepted 19 April 2010
 Available online 29 April 2010

Keywords:

Entamoeba
 Rab
 Small GTPase
 Vesicular traffic
 Encystation

ABSTRACT

Entamoeba invadens is a reptilian enteric protozoan parasite closely related to the human pathogen *Entamoeba histolytica* and a good model organism of encystation. To understand the molecular mechanism of vesicular trafficking involved in the encystation of *Entamoeba*, we examined the conservation of Rab small GTPases between the two species. *E. invadens* has over 100 Rab genes, similar to *E. histolytica*. Most of the Rab subfamilies are conserved between the two species, while a number of species-specific Rabs are also present. We annotated all *E. invadens* Rabs according to the previous nomenclature [Saito-Nakano, Y., Loftus, B.J., Hall, N., Nozaki, T., 2005. The diversity of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology* 110, 244–252]. Comparative genomic analysis suggested that the fundamental vesicular traffic machinery is well conserved, while there are species-specific protein transport mechanisms. We also reviewed the function of Rabs in *Entamoeba*, and proposed the use of the annotation of *E. invadens* Rab genes to understand the ubiquitous importance of Rab-mediated membrane trafficking during important biological processes including differentiation in *Entamoeba*.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Small GTP-binding proteins (GTPase) are molecular switches ubiquitously found in eukaryotes. These proteins are involved in various important cellular processes including cell proliferation, cytoskeletal assembly, and intracellular membrane traffic. Small GTPases are classified, based on their primary sequences, into five families: Ras, Rho/Rac, Rab, Sar/Arf, and Ran (Bourne et al., 1990; Takai et al., 2001). Rab small GTPases constitute the largest group of this superfamily and are essential regulators of vesicular transport (Novick and Zerial, 1997; Stenmark, 2009). Higher eukaryotes generally have a larger repertoire of Rab genes than unicellular eukaryotes. *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, and *Drosophila melanogaster*, for example, have 60, 29, and 29 Rab genes, respectively, while *Saccharomyces cerevisiae* has only 11 (Pereira-Leal and Seabra, 2001).

Membrane traffic plays an important role in the virulence of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, the causative agent of amebiasis. Regulation of membrane trafficking via Rab proteins has been well studied in *E. histolytica* (for a review, see Nozaki and Nakada-Tsukui, 2006). While a majority of parasitic protozoa possess reduced numbers of Rab genes, *E. histolytica* and *Tricho-*

monas vaginalis have an expanded repertoire of Rabs (Saito-Nakano et al., 2005; Carlton et al., 2007), suggesting that they rely heavily on Rab-mediated membrane trafficking. Among the more than 100 Rabs identified to date, the functions of only a half dozen *E. histolytica* Rabs, that is, EhRabA, 5, 7A, 7B, 11A, and 11B, have been demonstrated (Welter et al., 2005; Welter and Temesvari, 2009; Saito-Nakano et al., 2004; Nakada-Tsukui et al., 2005; Saito-Nakano et al., 2007; Mitra et al., 2007). Thus, the role of the complex Rab family in *Entamoeba* has only started to be unveiled.

The molecular mechanisms of stage conversion between the trophozoite and cyst stages remain largely unknown in *E. histolytica* (Eichinger, 1997; Singh and Ehrenkafer, 2009), due to the lack of an *in vitro* encystation system. Thus, encystation has been studied in *Entamoeba invadens*, a closely related reptilian pathogen that also forms quadrinucleate cysts (Eichinger, 2001; Wang et al., 2003). Vesicular traffic likely plays an important role in encystation because the trophozoite degrades unnecessary components and synthesizes and transports new molecules necessary for cyst formation (Picazari et al., 2008; Chatterjee et al., 2009). In this review, we propose the annotation of Rab genes from *E. invadens* to facilitate the understanding of the conservation and species-specific evolution of Rab in *Entamoeba*. We show that fundamental Rab-mediated vesicular trafficking is well conserved in *Entamoeba*. We also summarize and review previous studies that showed transcriptional changes of Rab genes under stress and during stage conversion in *E. histolytica*, and transcriptional differences between *E. histolytica* strains.

* Corresponding author. Address: Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Fax: +81 3 5285 1219x1173.

E-mail address: nozaki@nih.go.jp (T. Nozaki).

Table 1
Rab small GTPases in *E. histolytica* and *E. invadens*.

Rab subfamily	<i>Entamoeba histolytica</i>				<i>Entamoeba invadens</i>					
	EhRab isotype	Accession number	ID number	Protein length	C-terminal peptides	EiRab isotype	ID number	% Identity to Eh homologue	Protein length	C-terminal peptides
<i>I. Rab conserved in eukaryotes</i>										
Rab1	EhRab1A	XP_651336	EHL_108610	206	CXXX	EiRab1A	EIN_104660	83	207	CXXX
	EhRab1B	XP_649033	EHL_146510	200	XXCC	EiRab1B	EIN_033160	75	208	CXCX
	EhRab2A	XP_649924	EHL_146320	785	-	EiRab2A	EIN_200080	59	217	-
	EhRab2B	XP_649335	EHL_046390	214	-	EiRab2B	EIN_277910	84	211	-
	EhRab2C	XP_656786	EHL_067850	232	-					
Rab5	EhRab5	XP_655377	EHL_026420	196	XXCC	EiRab5A	EIN_277000	83	194	XXCC
						EiRab5B	EIN_051650	50 ^b	188	XGCC
Rab21	EhRab21	XP_651927	EHL_129330	204	XXCC					
	EhRab7A	XP_649196	EHL_192810	207	XGXC	EiRab7A	EIN_112310	91	205	XXCC
	EhRab7B	XP_656820	EHL_081330	208	XGXC	EiRab7B	EIN_202680	88	206	XXCC
	EhRab7C	XP_652334	EHL_189990	198	XXCC	EiRab7C	EIN_094230	67	213	XXCC
	EhRab7D	XP_651915	EHL_082070	205	XXCC	EiRab7D	EIN_133760	80	200	XXCC
	EhRab7E	XP_651202	EHL_169280	208	XXCC	EiRab7E	EIN_148860	87	206	XXCC
	EhRab7F	XP_650338	EHL_192130	202	XXCC	EiRab7F	EIN_235870	64	206	XXCC
Rab7	EhRab7G	XP_656477	EHL_187090	191	XXCC	EiRab7G1	EIN_015310	62	197	XXCC
						EiRab7G2	EIN_299020	61	193	XXCC
	EhRab7H	XP_653414	EHL_005900	198	XXCC	EiRab7H	EIN_288760	46	203	XXCC
	EhRab7I	XP_649308	EHL_189100	205	XXCC	EiRab7I	EIN_196420	66	206	XGXC
	EhRab8A	XP_653051	EHL_199820	200	XXCC	EiRab8A	EIN_232640	48	202	XXCC
	EhRab8B	XP_652309	EHL_127380	208	XXCC	EiRab8B	EIN_149010	67	207	XXCC
	EhRab11A	XP_647948	EHL_005460	208	XXCC	EiRab11A	EIN_165880	82	208	XXCC
Rab11	EhRab11B	XP_652776	EHL_107250	212	XXCC	EiRab11B	EIN_108540	74	213	XXCC
	EhRab11C	XP_649609	EHL_161030	213	XXCC	EiRab11C	EIN_014150	71	222	XXCC
	EhRab11D	XP_652598	EHL_056100	214	XGXC	EiRab11D	EIN_050950	65	211	XXCC
<i>II. Rab conserved in Entamoeba</i>										
RabA	EhRabA	XP_652258	EHL_168600	199	XGXC	EiRabA	EIN_280980	85	198	XGXC
	EhRabB	XP_652994	EHL_181240	193	XXCC	EiRabB	EIN_110330	69	198	XXCC
	EhRabC1	XP_656355	EHL_153690	205	XXCC	EiRabC1	EIN_058650	81	198	XXCC
	EhRabC2	XP_653593	EHL_045550	207	XXCC	EiRabC2	EIN_094390	81	206	XXCC
	EhRabC3	XP_652352	EHL_143650	209	XXCC	EiRabC3A	EIN_093190	89	207	XXCC
RabC	EhRabC4	XP_656897	EHL_096220	204	XXCC	EiRabC3B	EIN_089560	54	213	XXCC
	EhRabC5	XP_654231	EHL_122730	204	XXCC	EiRabC4	EIN_072390	57	200	XXCC
	EhRabC6	XP_654710	EHL_194280	195	XXCC	EiRabC5	EIN_014860	73	204	XXCC
	EhRabC7	XP_652882	EHL_079890	196	XXCC	EiRabC7	EIN_217920	70	201	XXCC
	EhRabC8	XP_651035	EHL_170390	196	XXCC	EiRabC8	EIN_168870	61	190	XXCC
	EhRabD1	XP_652887	EHL_059670	751	XXCC	EiRabD	EIN_184580	61	744	XXCC
	EhRabD2	XP_655208	EHL_164900	265	XXCC					
	EhRabF1	XP_651799	EHL_129740	203	CXXX	EiRabF1	EIN_239370	68	201	CXXX
RabF	EhRabF2	XP_651513	EHL_182030	194	XXCC	EiRabF2	EIN_106040	61	192	XXCC
	EhRabF3	XP_655210	EHL_164880	191	XXCC	EiRabF3	EIN_112540	70	188	XXCC
	EhRabF4	XP_654217	EHL_122870	191	XXCC	EiRabF4	EIN_239300	65	192	XXCC
	EhRabF5	XP_656060	EHL_117960	197	XXCC	EiRabF5	EIN_228360	85	196	XXCC
	EhRabH1	XP_657074	EHL_133100	209	XGXC	EiRabH	EIN_156660	78	217	XXCC
RabH	EhRabH2 ^a	XP_654758	EHL_128180	209	XGXC					
	EhRabI1	XP_655925	EHL_177550	202	XGXC	EiRabI	EIN_014210	65	204	XXCC
	EhRabI2	XP_654235	EHL_053420	214	XGXC					
	EhRabK1	XP_652298	EHL_024680	213	XXCC	EiRabK1	EIN_311490	81	210	XXCC
RabK	EhRabK2	XP_649362	EHL_040450	210	XXCC	EiRabK2	EIN_243000	65	200	XXCC
	EhRabK3	XP_651827	EHL_082550	234	XXCC					
	EhRabK4	XP_648284	EHL_128110	243	XXCC	EiRabK4	EIN_059050	40	227	XXCC
	EhRabK5 ^a	XP_655343	EHL_012380	240	XXCC	EiRabK5	EIN_028700	47	226	XXCC

RabL	EhRabL1 EhRabL2	XP_651210 XP_648952	EHL_169090 EHL_069500	207 257	XCCX XCCX	EiRabL1 EiRabL2	EIN_081690 EIN_061000	55 52	202 210	XXCC XCCX
RabM	EhRabM1 EhRabM2 EhRabM3	XP_652833 XP_652253 XP_651723	EHL_005010 EHL_004380 EHL_068230	212 204 205	XXCC XXCC XXCC	EiRabM1 EiRabM3	EIN_054310 EIN_052610	73 79	213 174	XXCC XXCC
RabN	EhRabN1 EhRabN2	XP_652702 XP_649426	EHL_048250 EHL_097650	202 199	XXCC XXCC	EiRabN1 EiRabN2	EIN_136950 EIN_054510	71 68	201 199	XXXX XXXX
RabP	EhRabP1 EhRabP2	XP_651771 XP_656067	EHL_114210 EHL_117890	204 204	CXXX CXXX	EiRabP	EIN_298880	59	205	CXXX
RabX1	EhRabX1	XP_650791	EHL_017740	191	XXCC	EhRabX1A EhRabX1B	EIN_299880 EIN_111560	49 53	167 190	– XXCC
RabX2	EhRabX2	XP_650041	EHL_001870	205	XXCC	EhRabX2A EhRabX2B	EIN_134920 EIN_099000	57 64	193 186	– CXXX
RabX3	EhRabX3	XP_655050	EHL_014220	202	XXXX	EhRabX3*	EIN_135850	47	340	–
RabX4	EhRabX4	XP_651716	EHL_100090	195	XXCC	EiRabX4	EIN_240170	44	191	XXCC
RabX5	EhRabX5	XP_657472	EHL_148660	217	XXXX	EiRabX6	EIN_123740	54	191	CXXX
RabX6	EhRabX6	XP_652555	EHL_008350	201	CXXX	EhRabX7	EIN_186210	47	204	CXXX
RabX7	EhRabX7	XP_654103	EHL_118920	197	CXXX	EiRabX9	EIN_243270	45	190	XXCC
RabX8	EhRabX8	XP_649911	EHL_178040	210	CXXX	EiRabX10	EIN_160760	45	193	CXXX
RabX9	EhRabX9	XP_654197	EHL_140770	183	XXCC	EhRabX11A EhRabX11B	EIN_014910 EIN_059070	84 77	209 209	XXCC XXCC
RabX10	EhRabX10	XP_656920	EHL_096440	189	CXXX	EhRabX11C	EIN_092300	44	205	–
RabX11	EhRabX11	XP_655922	EHL_177520	210	XXCC	EiRabX12	EIN_252860	51	209	XXCC
RabX12	EhRabX12	BAD82860	EHL_021210	199	XXCC	EiRabX14A	EIN_260390	42	228	XXCC
RabX13	EhRabX13	XP_653656	EHL_065790	208	XXCC	EiRabX14B	EIN_147580	46	354	XXCC
RabX14	EhRabX14	XP_657126	EHL_053150	354	XXCC	EiRabX15	EIN_238750	65	192	XXCC
RabX15	EhRabX15	XP_649287	EHL_177390	193	XXCC	EiRabX16	EIN_051300	47	214	XXCC
RabX16	EhRabX16	XP_655529	EHL_131170	204	XXCC	EiRabX17A EiRabX17B	EIN_072650 EIN_212470	68 57	197 197	CXXX CXXX
RabX17	EhRabX17	XP_656536	EHL_042250	201	CXXX	EiRabX17C	EIN_107380	51	208	CXXX
RabX18	EhRabX18A EhRabX18B ⁿ	XP_649285 XP_001913559	EHL_145720 EHL_177410	196 194	CXXX CXXX					
RabX19	EhRabX19	XP_654968	EHL_183080	207	XXCC	EiRabX19	EIN_288570	46	226	XXCC
RabX20	EhRabX20	XP_652547	EHL_003020	190	XXCC					
RabX21	EhRabX21	XP_650747	EHL_021480	212	CXXXX					
RabX22	EhRabX22A EhRabX22B ⁿ	XP_655103 XP_655064	EHL_157890 EHL_014060	197 197	XXCC XXCC	EiRabX22A EiRabX22B EiRabX22C	EIN_134610 EIN_075970 EIN_136400	68 65 62	197 184 197	XXCC XXCC XXCC
RabX23	EhRabX23	XP_650671	EHL_107140	187	XXCC	EiRabX23	EIN_241550	76	202	XXCC
RabX24	EhRabX24	XP_656866	EHL_038680	203	XXCC	EiRabX25	EIN_243640	64	189	XXCC
RabX25	EhRabX25	XP_653064	EHL_010660	192	XXCC	EiRabX26	EIN_224230	50	198	XXCC
RabX26	EhRabX26	XP_657341	EHL_151610	202	XXCC	EiRabX26B	EIN_060100	40	201	XCXC
RabX27	EhRabX27	XP_650814	EHL_158170	203	CXXX					
RabX28	EhRabX28	XP_647919	EHL_123220	186	CXXX					
RabX29	EhRabX29	XP_656310	EHL_184670	194	CXXX	EiRabX29	EIN_051680	64	198	CXXX
RabX30	EhRabX30	XP_651921	EHL_082230	183	CXXX	EiRabX30	EIN_148610	54	210	CXXX
			EHL_012030							
RabX31	EhRabX31	XP_648905	EHL_040310	194	XXCC	EiRabX31A EiRabX31B EiRabX31C EiRabX31D	EIN_127810 EIN_262240 EIN_191990 EIN_197670	70 62 42 43	189 191 170 170	XXCC XXCC XCXC XCXC
RabX32	EhRabX32	XP_651095	EHL_079230	203	CXXXX					
RabX33	EhRabX33A EhRabX33B ⁿ	XP_655812 XP_001914333	EHL_083390 EHL_135940	240 248	CXXX CXXX					

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Rab subfamily		<i>Entamoeba histolytica</i>										<i>Entamoeba invadens</i>									
EhRab isotype	Accession number	ID number	Protein length	C-terminal peptides	EhRab isotype	ID number	% Identity to Eh homologue	Protein length	C-terminal peptides	EhRab isotype	ID number	% Identity to Eh homologue	Protein length	C-terminal peptides							
RabX34	XP_650332	EHL_114640	200	CXXX	EhRabX34	EHL_114640				EiRabX34A	EIN_281740	68	204	CXXX							
RabX35	XP_649164	EHL_130670	195	XXCC	EhRabX35	EHL_130670				EiRabX34B	EIN_202640	63	200	CXXX							
RabX36	XP_657040	EHL_110300	203	-	EhRabX36	EHL_110300				EiRabX35	EIN_156720	52	197	XXCC							
RabX37	XP_652737	EHL_048720	184	XCXX	EhRabX37 ^a	EHL_048720															
RabX38	XP_656081	EHL_118280	202	CCXXX	EhRabX38 ^a	EHL_118280															
RabX39	XP_649044	EHL_094110	180	XXCC	EhRabX39 ^a	EHL_094110				EiRabX39	EIN_238590	44	198	XXCC							
RabX40	XP_657549	EHL_027640	189	-	EhRabX40 ^a	EHL_027640				EiRabX40	EIN_105380	63	189	-							
RabX41	XP_001913412	EHL_051090	189	CXXX	EhRabX41 ^a	EHL_051090				EiRabX41	EIN_186350	52	191	CXXX							
RabX42	XP_651849	EHL_040330	180	CXXX	EhRabX42 ^a	EHL_040330															
III. Rab specific to <i>E. histolytica</i>																					
RabX5	XP_657472	EHL_148660	217	XXXX	EhRabX5	EHL_148660															
RabX8	XP_649911	EHL_178040	210	CXX	EhRabX8	EHL_178040															
RabX13	XP_653656	EHL_065790	208	XXCC	EhRabX13	EHL_065790															
RabX18	XP_649285	EHL_145720	196	CXXX	EhRabX18A	EHL_145720															
	XP_001913559	EHL_77410	194	CXXX	EhRabX18B ^a	EHL_77410															
		EHL_008640																			
RabX20	XP_652547	EHL_003020	190	XXCC	EhRabX20	EHL_003020															
RabX21	XP_650747	EHL_021480	212	CXXXX	EhRabX21	EHL_021480															
RabX24	XP_656866	EHL_038680	203	XXCC	EhRabX24	EHL_038680															
RabX27	XP_650814	EHL_158170	203	CXXX	EhRabX27	EHL_158170															
RabX28	XP_647919	EHL_123220	186	CXXX	EhRabX28	EHL_123220															
RabX32	XP_651095	EHL_079230	203	CXXXX	EhRabX32	EHL_079230															
RabX33	XP_655812	EHL_083390	240	CXXXX	EhRabX33A	EHL_083390															
	XP_001914333	EHL_135940	248	CXXXX	EhRabX33B ^a	EHL_135940															
RabX36	XP_657040	EHL_110300	203	-	EhRabX36	EHL_110300															
RabX37	XP_652737	EHL_048720	184	XCXX	EhRabX37 ^a	EHL_048720															
RabX38	XP_656081	EHL_118280	202	CCXXX	EhRabX38 ^a	EHL_118280															
RabX42	XP_651849	EHL_040330	180	CXXX	EhRabX42 ^a	EHL_040330															
IV. Rab specific to <i>E. invadens</i>																					
RabZ1					EiRabZ1	EIN_050800				EiRabZ1	EIN_050800		204	XXCC							
RabZ2					EiRabZ2A	EIN_289320				EiRabZ2A	EIN_289320		200	CXXX							
					EiRabZ2B	EIN_285540				EiRabZ2B	EIN_285540		198	CXXX							
RabZ3					EiRabZ3	EIN_192430				EiRabZ3	EIN_192430		205	XXCC							
RabZ4					EiRabZ4A	EIN_297180				EiRabZ4A	EIN_297180		205	CXXX							
					EiRabZ4B	EIN_234530				EiRabZ4B	EIN_234530		195	CXXX							
RabZ5					EiRabZ5	EIN_039070				EiRabZ5	EIN_039070		203	XXCC							
RabZ6					EiRabZ6	EIN_051060				EiRabZ6	EIN_051060		187	XXCC							
RabZ7					EiRabZ7	EIN_058330				EiRabZ7	EIN_058330		207	XXCC							
RabZ8					EiRabZ8A	EIN_270650				EiRabZ8A	EIN_270650		191	CXXX							
					EiRabZ8B	EIN_261500				EiRabZ8B	EIN_261500		150 (partial)								
RabZ9					EiRabZ9	EIN_281720				EiRabZ9	EIN_281720		203	XXCC							
RabZ10					EiRabZ10	EIN_105040				EiRabZ10	EIN_105040		234	CCXXC							
RabZ11					EiRabZ11	EIN_256390				EiRabZ11	EIN_256390		207	CXXX							
RabZ12					EiRabZ12	EIN_038850				EiRabZ12	EIN_038850		207	CXXX							
RabZ13					EiRabZ13	EIN_016980				EiRabZ13	EIN_016980		198	XXCC							
RabZ14					EiRabZ14	EIN_061010				EiRabZ14	EIN_061010		147 (partial)	-							
RabZ15					EiRabZ15	EIN_050890				EiRabZ15	EIN_050890		212	CXXX							
RabZ16					EiRabZ16	EIN_071820				EiRabZ16	EIN_071820		195	CXXX							
RabZ17					EiRabZ17	EIN_200260				EiRabZ17	EIN_200260		181	CXXX							
RabZ18					EiRabZ18	EIN_020600				EiRabZ18	EIN_020600		204	XCCX							
RabZ19					EiRabZ19	EIN_017280				EiRabZ19	EIN_017280		200	XXCC							
RabZ20					EiRabZ20	EIN_238400				EiRabZ20	EIN_238400		184	CXXC							

RabZ21	EiRabZ21	EIN_089250 EIN_026250 EIN_169660 EIN_169890	201	XXXX
RabZ22	EiRabZ22	EIN_165400	213	XXXXXXXXXX
RabZ23	EiRabZ23	EIN_155360	200	—
RabZ24	EiRabZ24	EIN_055510	230	XXXX
RabZ25	EiRabZ25	EIN_111890	204	XXXX
RabZ26	EiRabZ26	EIN_244150	184	XXXX

The annotations of *E. histolytica* Rabs are based on a previous publication (Saito-Nakano et al., 2005). The annotations of *E. invadens* Rabs were made on the basis of their percentage identity to the closest *E. histolytica* homologue and by phylogenetic inferences (Fig. 1).

^aNewly found *E. histolytica* Rab genes in this study.

^b32% homology to EiRabZ21.

^cEiRabX3 contains two GTPase domains.

2. Methods

2.1. Survey of Rab GTPases in the *E. invadens* and *E. histolytica* genome databases

Nucleotide and protein sequences of *S. cerevisiae* and *H. sapiens* Rabs were retrieved from GenBank, National Center of Biotechnology Information (NCBI). For the accession numbers of these proteins, see (Pereira-Leal and Seabra, 2001). We searched the *E. invadens* genome database (<http://pathema.jcvi.org/cgi-bin/Entamoeba/PathemaHomePage.cgi>) using all yeast and human Rab protein as queries by BLASTP. The *E. invadens* genome database was also searched by BLASTP using EiRab1A as a query. All potential small GTPase genes were further examined by BLASTP analysis against the human database at NCBI; *E. invadens* entries that showed the highest homology to Rab from *Entamoeba* or other organisms were considered to be *E. invadens* Rabs. The *E. histolytica* genome database (release 7.0) at Pathema Bioinformatics Resource Center (<http://pathema.jcvi.org/Pathema/>) was also searched and 11 previously unannotated *E. histolytica* Rab genes were identified. One hundred and twenty-one *E. invadens* and 11 newly found *E. histolytica* small GTPases were manually inspected to verify the presence of three GTP-binding consensus sequences (GDXXVGKT, DTAGQE, and GNKXD) and five additional conserved regions that are specific to the Rab family (IGVDF, KLQJW, RFRSIT, YYRGA, and LVYDIT) (Pereira-Leal and Seabra, 2000). One hundred and two *E. histolytica* and 121 *E. invadens* putative Rabs were designated according to the previous nomenclature (Saito-Nakano et al., 2005).

2.2. Phylogenetic analysis

Highly conserved domains stretching from the first to the third GTP-binding consensus regions of *E. histolytica*, *E. invadens*, *S. cerevisiae*, and *H. sapiens* Rab proteins were aligned using the CLUSTAL W program version 1.81 (Thompson et al., 1994) with default parameters. Alignments were manually inspected and corrected, and gaps were removed. Finally, 110 unambiguously aligned sites were selected for phylogenetic analysis by the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). Phylogenetic trees were drawn using TreeView software (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>).

3. Results and discussion

3.1. Annotation and conservation of *E. invadens* Rabs

3.1.1. Identification of new *E. histolytica* Rabs

We previously annotated 91 Rab genes in *E. histolytica* using the *E. histolytica* genome database available at TIGR (as of February 24, 2005; Saito-Nakano et al., 2005). A thorough search of the latest genome database at Pathema (version 7.0) identified 11 additional Rab genes; accordingly the current number of *E. histolytica* Rab genes increased to 102 (Table 1). The newly identified genes were annotated as RabH2, K5, X18B, X22B, X33B, and X37–42 (Table 1).

3.1.2. Assignment of *E. invadens* Rabs

We identified 121 putative Rab genes in the *E. invadens* genome database at Pathema. The number of *E. invadens* Rab genes was 20% higher than that of *E. histolytica*. *E. invadens* Rab entries were grouped based on their similarity to the corresponding *E. histolytica* homologues and also by phylogenetic inference (Table 1 and Fig. 1). Among the ubiquitous Rabs conserved in eukaryotes (Rab1~21), all isoforms of Rab1/8, 2, 5, 7, and 11 subfamilies that are present in *E. histolytica* are conserved in *E. invadens*, with the