

厚生科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)
分担研究報告書

赤痢アメーバの病原機構の解明

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 赤痢アメーバ症を始めとする腸管原虫症はアジア・アフリカにおける重要な感染症である。本研究では、赤痢アメーバをモデルとして、本原虫における代謝経路の全容の解明を目的として、網羅的遺伝子発現解析を継続的に行った。赤痢アメーバ栄養型は寄生・組織侵入時に様々な酸化ストレスに暴露し、その応答が生存に必須であり、この点を解析の中心とした。その一助として、赤痢アメーバのアミノ酸飢餓下での応答の解析を行った。更にその遺伝子の一部に関して機能解析を行った。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症(アメーバ赤痢並びに腸管外アメーバ症)は熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心に世界の人口の約1%が感染する重要な原虫性腸管感染症である。我が国では、男性同性愛者および知的障害者において高い感染率を示し、問題となっている。その遺伝子情報は、全ゲノムの読了により明らかにされ(Lofus Nature 2005)、本原虫の研究に不可欠な核酸情報の基盤的は明らかにされている。一方、原虫が感染過程で暴露される様々な宿主由来の酸化ストレス応答等に関しては、未解明な点が多く、網羅的遺伝子解析による俯瞰的理解が不可欠である。

本年度は昨年度同定された鉄イオウフラビンタンパク質 ISF の役割について解明した。

B. 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6(Louis Buddy Diamond の分離による)の培養は常法の無菌培養法に従った。

2. 過剰発現体の作成

Iron sulfur flavoprotein 1 (ISF1)及び ISF2 遺伝子の ORF の N-末端部分 420bp を pSAP2-Gunma ベクターに挿入し、gene silencing 用プラスミドを作成した。赤痢アメーバ形質転換体の作成はリポ

フェクションを用い、常法に従った。(倫理面への配慮)本研究に関わる病原体の取扱に関する許可は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. ISF 遺伝子の発現抑制による細胞増殖への影響

赤痢アメーバの栄養型をシス테인枯渇下で発現上昇の見られた2種の ISFs (ISF1, EHI_138480; ISF2, EHI_025710) の生理的役割を明らかにするために、これらの遺伝子の発現抑制体を epigenetic transcriptional gene silencing 法により作成した。本方法は antisense small RNA を介した転写レベルでの制御により目的遺伝子の発現を抑制する方法である。RT-PCR でこれら遺伝子の発現抑制を確認したところ、ISF1, 2 共に RNA は大きく減少していた(図1)。一方、その他の遺伝子に対する影響は極めて少なかった(データ示さず)。

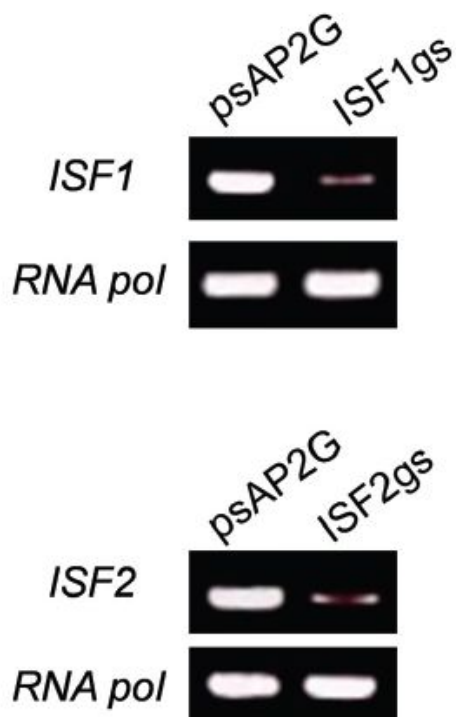


図1 ISF1, 2のgene silencing法による発現抑制のRT-PRによる確認。RNA polymeraseをcontrolとした。

次に、ISF1, 2の発現抑制による増殖への影響を増殖動態の解析により明らかにした(図2)。通常のin vitro培養条件ではpsAP2のcontrolに比べてISF1 gene silence株では増殖に変化がなかった。一方ISF2では軽微な増殖阻害が見られた。またシステインの枯渇下では、controlに比べてISF1 gene silenceにより軽微な、ISF1の抑制により重篤な増殖阻害が観察された。

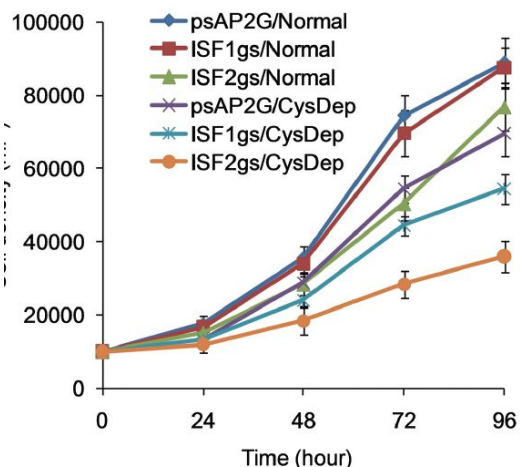


図3 ISF1, 2の発現抑制によるシステイン存在又は非存在下での栄養型の増殖。縦軸は1mlあたりの細胞数を表す。

2. ISF遺伝子の発現抑制による酸化ストレスへの抵抗性の変化

ISF1及びISF2の発現抑制による参加ストレス応答への影響を知るために、これらの発現抑制体の過酸化水素に対する抵抗性を評価した(図3)。0.8-6.4 mMの過酸化水素に対するこれら発現抑制体の感受性はコントロールと比較していずれの濃度でも差が見られなかった。

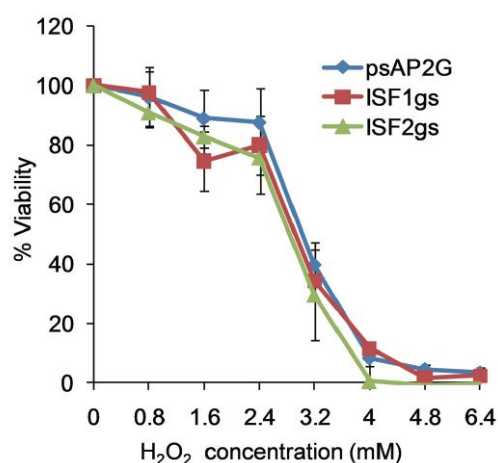


図3 ISF1, 2の発現抑制による過酸化水素に対する抵抗性の変化

D. 考察及び結論

赤痢アメーバは主要な抗酸化物質で

あるグルタチオン並びに、グルタチオン生合成、還元系を持たない。一方で一部の細菌の有する鉄イオウクラスターとフラビンを活性中心に有する ISF タンパク質群を多く有している。更に本原虫に選択的に存在する NADPH 依存性酸化還元酵素(EhNO1, 2)などに代表される特殊な酸化ストレス防御機構を有している。これらは一般の原核・真核生物と異なる進化的に重要な生物学的な特徴である。

本年度はこれまでの網羅的発現解析により同定された ISF のうち、2 種の ISF1, 2 に注目し、gene silencing 法で発現抑制した形質転換体を用いてその生理的役割を調べた。その結果、ISF1, 2 いずれも細胞の増殖に、特にシステイン飢餓状態での増殖に関与していることが示された。一方で予想に反して、過酸化水素に対する酸化ストレスへの応答は改善されなかった。このことは ISF1, 2 の単独の過剰発現は過酸化水素への抵抗の賦与には不十分であることを示す一方で、ISF1, 2 の抗酸化ストレス応答への関与の否定には不十分であると考えられた。複数の ISF が相補的な重複した機能を担う可能性もあり、複数遺伝子の同時抑制による問題点の解明が今後不可欠となると結論された。

E . 健康危険情報

該当せず

F . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当せず。

2. 実用新案登録