

厚生科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

腸管系寄生虫症の解析
(Analysis of enteric protozoan infections)

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長
Tomoyoshi Nozaki, Director, Department of Parasitology
National Institute of Infectious Diseases

研究要旨 ジアルジア症・赤痢アメーバ症・クリプトスポリジウム症はアジア・アフリカにおける重要な腸管寄生原虫症である。本研究はインド NICED との共同研究を通じて、分子疫学的手法を用いたジアルジア症の感染実態調査を行うとともに、ジアルジア・赤痢アメーバ等の病原・寄生機構等の解明を行っている。2年度は、ジアルジアからの感染ウイルスの特定を目指すために、西ベンガル州におけるジアルジア症の病原株の確立を目指すと共に、赤痢アメーバにおける抗酸化機構の分子機構を明らかにした。Abstract Giardiasis, Amoebiasis, and Cryptosporidiosis are the important enteric protozoa in Asia and Africa. The objective of the present study include molecular epidemiological survey of enteric protozoan infections in the state of West Bengal and molecular characterization of the mechanisms involved in parasitism and virulence of *Entamoeba* and *Giardia*. We, in the second year, investigated molecular mechanisms of anti-oxidative stress mechanisms by metabolic profiling of *Entamoeba* under the oxidative stress.

A . 研究目的

腸管感染症は世界の死亡の約 4% (216 万人) を占める重要な感染症である (WHO Report, 2009)。これは HIV/AIDS、結核と同様に極めて重要な死因の一部を占める。腸管感染症のうち原虫症として重要なのは、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症、マイクロスποリジウム症、イソスポーラ症などであり、これらが原虫が原虫性下痢症の大部分を占める。赤痢アメーバ症が開発途上国を中心として世界の人口の約 1% に感染し、年間 10 万人の死者を生む重要な原虫である。一方、ジアルジア症・クリプトスポリジウム症などは特に途上国での小児の感染率は極めて高いものの、小児の発育・発達に大きな影響を

与え、高い DALY の原因となる。

本研究では、インドコルカタにある Indian Council of Medical Research (ICMR) の感染症研究所のひとつである National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED) と、腸管原虫症に関する共同研究を行う。その目的は、アジア、特に南アジアとの腸管原虫症研究の連携を強化し、情報ネットワークを構築することにある。人的交流を通じてお互いの研究能力の向上と病原体検出の情報の早期収集に有用なネットワークを構築することを間接的な目的とする。

B . 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS

c16(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. メタボローム解析

メタボローム解析はキャピラリー電気泳動飛行時間計測型質量分析法(CE-ToFMS)により行った。方法の詳細は Husain J Biol Chem 2010 に詳述した。Anion, Cation モードでの計測で、約 90 の中間代謝産物を定量した。

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. 酸化ストレスによる細胞死と細胞内活性酸素種の産生

赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答をモニターした。パラコートや過酸化水素に対して図1に示すように感受性を示した。更に、1mMのパラコートによる処理により時間依存的に細胞内のROSが上昇することが示された。

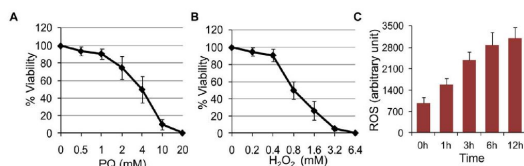


図1 酸化ストレス(A, パラコート; B, 過酸化水素)による細胞の生存率及び1mMパラコート処理による細胞内Reactive oxygen speciesの量の動態

2. 代謝産物のプロファイリング

パラコート、過酸化水素を加え、継

時的に1, 3, 6, 12時間後の代謝産物を抽出し、CE-ToFMS解析により、全代謝産物を計測した。図2に示すように、パラコート及び過酸化水素の処理により様々な代謝物の増減が観察された。多くの変化はパラコートと過酸化水素に共通していたが、いずれかに選択的に観察された変化も見られた。

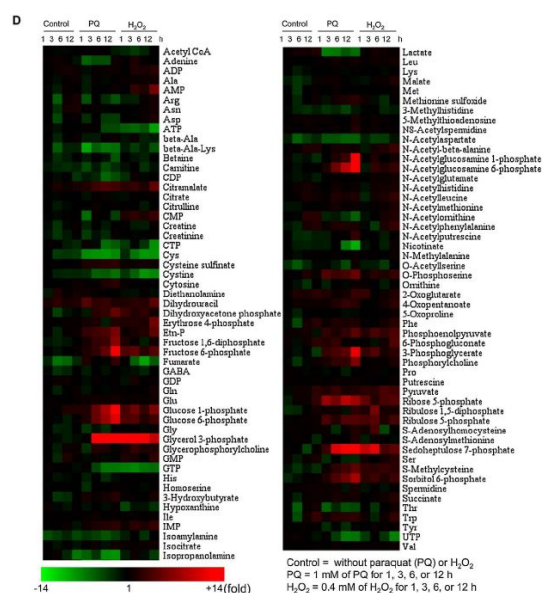


図2 計測された全代謝産物の経時変化(ヒートマップ: time 0を基準に減少を緑で増加を赤で示す) Control(無処理)、パラコート、過酸化水素処理でそれぞれ1, 3, 6, 12時間後の代謝産物の変化を示す

3. 酸化ストレスによる中心炭素代謝への影響

図3に図2に示したデータのうち、中心代謝(解糖経路を中心として)を示した。パラコートで過酸化水素に比してより高度な変化が見られたが、増減の方向は多く近似していた。解糖経路の中間代謝物、特に上流の代謝物の多くは、酸化剤への暴露により、上昇した。更にDihydroxyacetone phosphate (DHAP)が高度に蓄積した。

N-acetylglucosamine 6-phosphateを始めとして中心代謝は多くキチン

の生合成経路に redirect されていた。この傾向は特にパラコート処理により顕著で、酸化ストレスが細胞分化の誘因因子であることが示された。

更に Erythrose 4-phosphate, Sedoheptulose 7-phosphate, Ribose 5-phosphate などペントースリン酸経路への流入が増加していた。

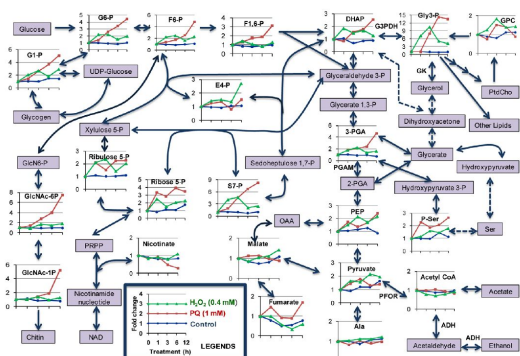


図3 酸化ストレス（赤，パラコート；緑，過酸化水素）による中心炭素代謝物の変化を示す

4. 酸化ストレスのヌクレオチドリン酸、エネルギー量への影響

酸化ストレスのヌクレオチドリン酸への影響は、パラコートと過酸化水素で似ていたが、増減は過酸化水素により、より強く見られた。過酸化水素暴露では、特に ATP が増減し、ADP, AMP は時依存的に減少した。同時に Energy charge は過酸化水素処理により、40-50%減少し、細胞内でのエネルギーの枯渇が生じていることが確認された。

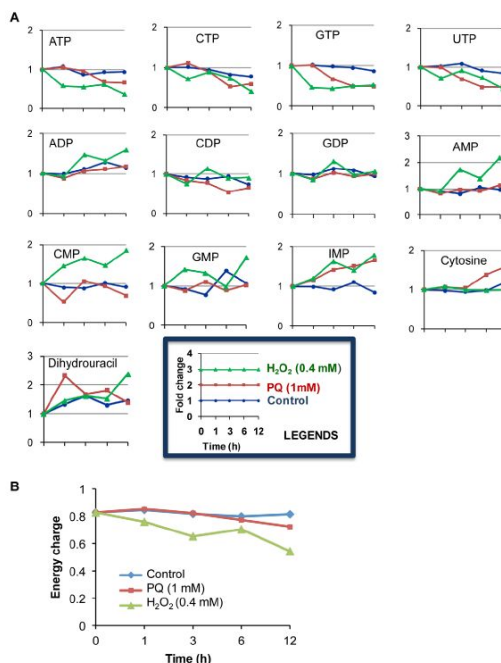


図4 ヌクレオチドリン酸、及びエネルギー量への酸化ストレスの影響（赤，パラコート；緑，過酸化水素）

4. 酸化ストレスによる解糖経路及び発酵に関する酵素の活性への影響

パラコートにより、解糖経路及び発酵（特にエタノール・酢酸発酵）に関する酵素の活性が影響されるか、検証した（図5）。特に、Phosphoglycerate mutase 及び Pyruvate: ferredoxin oxidoreductase が強い活性阻害を受けた。

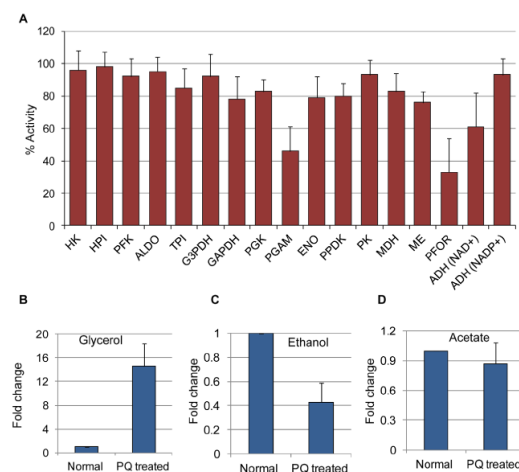


図5 パラコート暴露(1mM 12時間)による解糖経路及び発酵に関する酵素の活性の変化(A)、及びグリセロール、エタノール、酢酸の細胞内濃度の変化(B-D)

5. 酸化ストレスのグリセロール、エタノール、酢酸の細胞内濃度に対する影響

図5に示されるように、パラコート暴露はエタノール量を約半分に減らした、一方、グリセロールは14倍蓄積した。酢酸量は変化が見られなかった。

D. 考察及び結論

ジアルジア症は腸管原虫症の中で最も感染者が多いが、その病原機構・酸化ストレス耐性機構・細胞分化・遺伝子発現制御を始め不明な点が多い。我々はNICED側が解析を進めるジアルジアの酸化ストレス機構の解析に直接的・間接的に協力を与え、同時に基盤的研究における相互作用を強化することを目的として、赤痢アメーバにおける同様の解析を実施した。

CE-ToFMSを用いた代謝産物の網羅的同定は、約100の極性を有する代謝物の同定・定量を効率よく行うことができ、原虫だけでなく、細菌・真菌、更にウイルス等に感染した哺乳動物細胞等の代謝変化を解析するために、極めて有効な手法である。

我々は原虫が哺乳動物に侵入し、組織傷害を起こす際に暴露される酸化ストレスに対して、原虫側がどのような代謝調節を行い、ストレス応答を行い、寄生・病害を達成しているかを理解するかを目的として、2種類の酸化物に暴露された赤痢アメーバ栄養型から代謝物を抽出し、CE-ToFMSを用いて網羅的代謝プロファイリングを行った。これにより、結果に詳述した極めて新規性の高い多くの発見をした。第一に、酸化ストレスにより解糖経路が停止し、その代謝フラックスがキチ

ン合成、ペントースリン酸経路へ方向転換されることを発見した。同時に細胞内エネルギー量が減少し、総合すると、酸化ストレスにより、エネルギーを消費するとともに、新規エネルギー合成を解糖経路で行わなくなることが示された。第二に、酸化ストレスにより、グリセロール3リン酸を介したグリセロールの合成、同時にATPの合成が行われることが明らかとなった。これにより、解糖経路、エタノール発酵によるATP合成がグリセロール発酵によるATP発酵に転化されていることが明らかとなった。今後これらの代謝変化が、ジアルジア等他の嫌気的原虫でも見られるかを、同様の方法により、NICEDとの共同研究により確認することができれば、嫌気的腸管原虫全般における代謝の酸化ストレス応答を一般化・普遍化できると予想される。

以上、本年度は赤痢アメーバにおける代謝解析により、赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答の代謝に関する側面の解析をほぼ終えることができた。本成果は、NICEDとの代謝解析のプラットフォームの共有に資すると思われる。

E. 健康危険情報 該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- (i) Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1831, 2012.
- (ii) Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica*

d-phosphoglycerate
dehydrogenase and
phosphoserine aminotransferase.
Biochimie. 94, 1676-1686, 2012.

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
該当せず

A . Introduction

Enteric protozoan infections are mainly caused by *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, and *Cryptosporidium hominis/parvum*. Enteric protozoan diseases are considered to be equally important to viral and bacteria infections. Amebiasis affects approximately 1% of the whole world population and causes 100 thousands death annually. Giardiasis and cryptosporidiosis also show very high prevalence in developing countries, and severely affects physical and cognitive growth in children.

In this collaboration with the parasitology section at NICED, Indian Council of Medical Research (ICMR), Kolkata, India, we have been working together for both molecular epidemiology of enteric infections as well as establishing common platforms to investigate molecular mechanisms and systems that allow parasitism and pathogenesis in humans. Such collaborative works should facilitate capacity building of both groups and enhance exchange of information of emerging and reemerging enteric protozoan infections, and consequently should benefit health administration of the both countries as well as the whole Asian region.

B . Materials and methods

1. Cultivation

Cultivation of trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM-1: IMSS cl6(Louis Buddy Diamond) should be consulted in their original articles.

2. Metabolomic analysis

Metabolomic profiling was carried

out using a capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometer. Details of the methods were previously described by Husain (J Biol Chem 2010). Approximately 90 intermediary metabolites were measured using both anion and cation modes.

(Ethical clearance) We have obtained all necessary clearance and permissions on biosafety- and biodiversity-related investigations.

C . Results

1. Cell death and production of reactive oxygen species (ROS)

Cell death and ROS production were measured in *E. histolytica* trophozoites exposed to oxidative stress: paraquat and hydrogen peroxide (Figure 1).

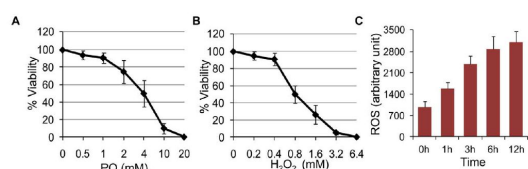


Figure 1. Percentage viability of trophozoites exposed to the indicated concentrations of 1 mM of paraquat (PQ) or hydrogen peroxide (A or B, respectively). ROS concentrations in trophozoites to exposed to 1 mM PQ for the indicated period of time.

2. Metabolic profiling of ROS-exposed trophozoites

Trophozoites were incubated with PQ or hydrogen peroxide for 11, 3, 6, or 12 hours, then metabolites were extracted for CE-ToFMS analysis. As shown in Figure 2, dramatic global

changes of various metabolites were observed. Changes common to both treatment as well as treatment-specific changes were observed.

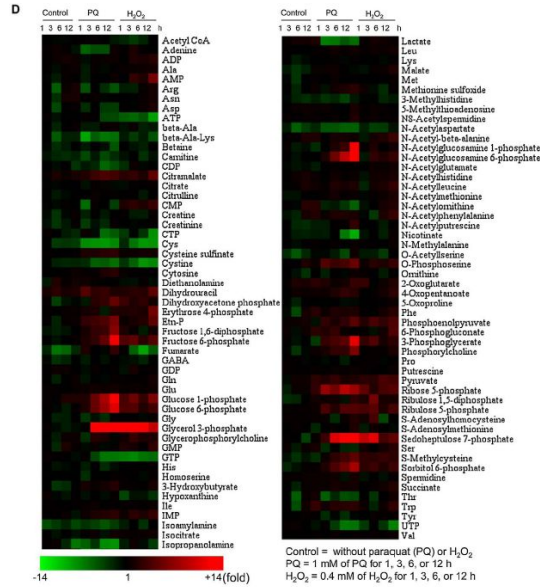


Figure 2 Global changes of metabolites in a time course (shown in relative to time 0). Increase and decrease are shown in red and green, respectively. Changes at 1, 3, 6, or 12 hours of control, PQ-treated, and hydrogen peroxide –treated samples are shown.

3. Influence of oxidative stress on the central energy metabolism

The extracted data exclusively on the central energy metabolism are shown in Figure 3. It was generally observed that the changes caused by PQ were larger than those by hydrogen peroxide, while the directions of changes (up or down regulation) were similar. Among the glycolytic pathway, metabolites in the upstream of the pathway were more affected. Furthermore, it was observed that dihydroxyacetone

phosphate (DHAP) was highly accumulated.

A number of metabolites including N-acetylglucosamine 6-phosphat, involved in the chitin biosynthesis, were increased. The upregulation was more pronounced in the PQ-treated trophozoites.

In addition, intermediates in the pentose phosphate pathway, including erythrose 4-phosphite, sedoheptulose 7-phosphate, and ribose 5-phosphate were increased.

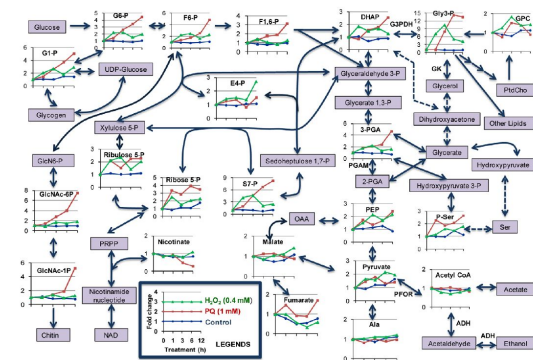


Figure 3 Effects of oxidative stress (red, PQ; green, hydrogen peroxide) on the central carbon metabolism

4. Effects of oxidative stress on nucleotides and energy charge

Effects by PQ and hydrogen peroxide were similar, but they were more remarkably pronounced in trophozoites treated with hydrogen peroxide. Among nucleotides, ATP was most highly affected, together with a concomittant increase in AMP and ADP. In addition, the energy charge was decreased by 40-50%, suggestive of the deprivation of energy in the cell.

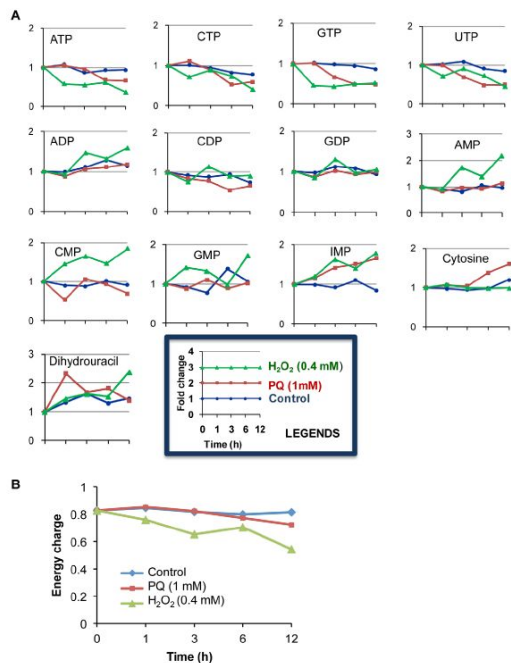


Figure 4. Effects of oxidative stress on nucleotides and energy charge (red, PQ; green, hydrogen peroxide)

4. Effects of oxidative stress on the activities involved in glycolysis and fermentation

Effects of PQ on the individual enzymes involved in glycolysis and fermentation were examined (Figure 5). Two enzymes were severely affected: phosphoglycerate mutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase.

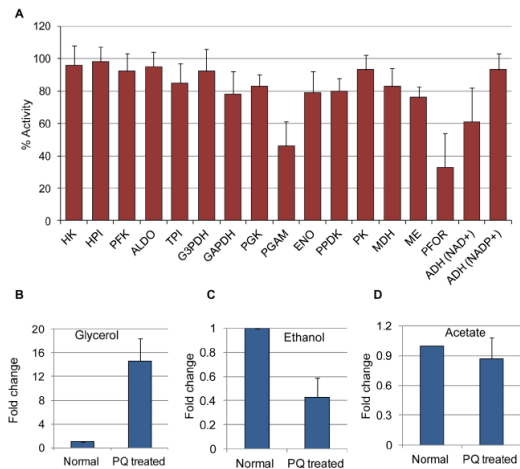


Figure 5. Effects of PQ on activity of enzymes in glycolysis and fermentation (A). Intracellular concentrations of glycerol (B), ethanol (C), and acetate (D) in normal and PQ-treated (1 mM 12hours) trophozoites.

5. Effects of oxidative stress on intracellular concentrations of glycerol, ethanol, and acetate

PQ treatment severely decreased the ethanol concentration by 50%, while it cause a 14-fold increase in the glycerol concentration (Figure 5). No change was observed for acetate.

D. Discussion

Although giardiasis, among the enteric protozoan parasites, most widely affect residents, particularly children, in developing countries, its molecular mechanisms of pathogenesis, anti-stress defense, differentiation, and regulation of gene expression largely remain to be investigated. We are working closely together with a group in NICED, on the antioxidative stress mechanisms in *Giardia*. As a part of this collaboration, we tried to

generalize their observations made on *Giardia* by confirming them in another common intestinal protozoan parasite *Entamoeba*. At the same time, we established a platform of metabolism analyses that can be used in general in any pathogens including bacteria, fungi, and parasites. CE-ToFMS-based metabolomics is robust and enables simultaneous detection and quantitation of >100 intermediary metabolites.

Using this highly sensitive and robustly quantitative platform, we made a number of unprecedented findings on the metabolic changes during oxidative stress in *E. histolytica*. First, we demonstrated that oxidative stress caused dynamic redirection of the glycolytic pathway toward other two major associated pathways: chitin biosynthesis and the pentose phosphate pathway. Concomitantly, the glycolytic pathway was ceased, and this is at least in part due to inhibition of the two major flux-limiting enzymes in glycolysis: phosphoglycerate mutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase. Second, oxidative stress caused a shift of energy production due to the inability to synthesize ATP via glycolysis and ethanol and acetate fermentation. Instead, the trophozoites produce glycerol derived from dihydroxyacetone phosphate via glycerol 3-phosphate with concomitant production of ATP.

We are currently planning to test whether the observation made in *E. histolytica* are also observed in *Giardia* using the platform used in the present study to generalize the

observations or discover novel aspects in stress response in *Giardia*.

F . Publications

- (i) Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. PLoS Negl. Trop. Dis. 6, e1831, 2012.
- (ii) Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica* d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. Biochimie. 94, 1676-1686, 2012.

G . Patents

None

