

厚生労働科学研究費委託費
(新興再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
委託業務成果報告書

「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの推進と共同研究体制の強化に関する
研究(業務主任者 倉根一郎)」

東アジアに存在する赤痢アメーバ株のゲノム解析と新規病原関連遺伝子の機能解析

業務分担者 津久井 久美子 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

業務協力者 泉山 信司 (国立感染症研究所 寄生動物部)

業務協力者 Avik Kumar Mukherjee (国立感染症研究所 寄生動物部)

業務協力者 佐藤 映美 (国立感染症研究所 寄生動物部)

研究要旨: 赤痢アメーバ症は日本国内で最も症例数の多い原虫感染症である。日本、台湾を含む東アジア地域では男性同性愛者や施設生活者における赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)感染の蔓延があり、欧米では相同のグループで非病原性の *E. dispar* 感染が主であるのと状況を異にする。この原因として宿主側と原虫側の因子が想定されるが、本研究では原虫側因子に注目して解析を行う。台湾CDCとの協力により得られた非病原性赤痢アメーバ株のゲノム解析と新規病原関連遺伝子の機能解析を行ったので報告する。

A. 研究目的

Entamoeba histolytica 感染によって起こるアメーバ症は国内で最も症例数の多い原虫感染症である。患者便から排出される嚢子(シスト)を経口摂取することで伝播するため、衛生状態の悪い開発途上国の病気と認識されがちであるが、東アジアにおいては主に特殊なリスクグループにおける国内感染例が確認される。すなわち sexually active な男性同性愛者や衛生環境を保つのが困難である知的障害者や老人施設生活者である。欧米の同様なコミュニティでは非病原性の *E. dispar* が蔓延しており、この差を生じる原因は未だに解明されていない。さらに日本国内

での症例報告は増加の一途であり、2009 年度～2011 年度は 800 例前後であったが 2012 年度には 900 例、2013 年度には 1000 例を越えた。特に 2013 年度は女性患者の増加が明らかとなり、男女間の性感染症として再興感染症としてのリスクが現実のものとつた。

赤痢アメーバの感受性に関連する人側の因子として、ヒト白血球型抗原(human leukocyte antigen: HLA)クラス II の DQB1*0601 抗原が防御的に働くこと、PI3K/Akt を介した増殖シグナルが弱くなるレプチンレセプターの Q223R アリル保持者は感受性が強いことが明らかにされた(Duggal et al., 2004; Duggal et al., 2011)。レプチンレセプターの 223R アリルは東アジア地

域で、223Q アリルは欧米で優位であるというデータとあわせると赤痢アメーバ感受性の違いはレプチンレセプターのアリルで一部説明できるのかも知れない。肥満細胞から分泌されるレプチンは炎症性サイトカインとしてレプチンレセプターを介したシグナルを活性化し、抗アメーバ効果を示すと考えられる。レプチン量は肥満細胞の量、すなわち栄養状態に左右される。栄養状態が悪いとは考えにくい東アジア地域の患者におけるレプチンシグナルの重要性は今後検討されるべきである。

原虫側の因子は PCR による遺伝子増幅とそれに続く配列解析による遺伝子型別により関連を見出す努力がされてきた。多型のある遺伝子として chitinase, srine-rich *E. histolytica* protein が解析されたが病原性との関連は示されず、その後開発された tRNA 遺伝子間に存在する short tandem repeat (STR) の複数座の解析のより肝膿瘍と一つの STR に関連があることが示された (Ali et al., 2012)。しかし STR 解析の結果は地域差が大きく、赤痢アメーバに普遍的に該当すると結論できるのか、議論が残る。

本研究では欧米と異なる流行を見せる東アジアの赤痢アメーバ症における、ユニークな原虫側の病原因子の発見を目指す。これまでの共同研究の成果により台湾 CDC より供与された非病原性の赤痢アメーバ株 2 株のゲノム解析の開始と、以前比較ゲノム解析により見出した無症候性赤痢アメーバ株で欠損していた遺伝子 (EHI_176590, AIG1 family protein) の機能解析を行ったので報告する。EHI_176590 は無症候性赤痢アメーバ株で欠損していたことから病原性に関与する遺伝子と考えられる。赤痢アメーバの接着性は宿主組織への定着だけでなく貪食を介した免疫細胞からの回避や共生バクテリアの捕食といった赤痢アメーバの生存にも深く関わる生物現象である。そこで EHI_176590 遺伝子の有無が異なる臨床分離株で赤血球との接着能を解析した。さらに EHI_176590 遺伝子を高発現させた細胞でみられた細胞表面の突起の性状解析を行った。

B. 研究方法

1) 赤痢アメーバ台湾株のゲノム解析

1-1 ゲノムDNAの調製

台湾CDCで樹立された二種類の赤痢アメーバ株、1198株・1446株からゲノムDNAを調製し、eurofin genomicsにおいてライブラリー作成とHiSeq2000によるリードの取得を行った。すなわちゲノムDNAはQIAGEN社のBlood & Cell Culture DNA Midi Kitを使用し、マニュアルの方法に一部変更を加えて行った。すなわち、マニュアル中のbuffer C1をNP-40 buffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM MgCl₂, 320mM Sucrose, 1% NP-40)に変更した。

ゲノムDNAサンプルはLife TechnologiesのQubit dsDNA HS Assay kitにより濃度測定を行い、agrose gel電気泳動により品質の確認を行った。取得したゲノムDNAを元にHiSeq2000によりリードを取得し、1198株に関しては100bp+100bpのペアエンドリードを、1446株に関しては8kbのlong jump distanceリードを取得した。

1-2 Next Generation Sequencer (NGS)による解析データの概要

Eurofin より得たアダプター配列を除去したりード情報はCLC genomics workbenchソフトにより解析、得られたゲノムリード情報を整理した。

1-3 ゲノムマッピング

得られたゲノムリードについて、現在AmoebaDB (<http://amoebadb.org/amoeba/showApplication.do>) で公開されている赤痢アメーバゲノム (HM1: IMSS株: メキシコ、下痢症由来株) にCLC genome work benchを用いてマッピングを行った。

1-4 違いのある遺伝子の抽出

今回解析を行った台湾株はいずれも台湾へ労働者として入国した外国人労働者の健康診断の一環で発見された無症候性株である。よってゲノムデータとして公開されているHM1株 (腸アメーバ症株) との比較により病原性の違いを規定する因子、また流行地域の違いを反映する多様性を見出すことが期待された。そこでタンパク質コード領域に存在する変異の抽出を行った。

1-5 無症候性株で発見された遺伝子変異の確認

以前我々が赤痢アメーバ国内分離株の比較ゲノ

ミクスより無症候性株で欠損していることが明らかになった遺伝子について、今回解析した2株について変異があるか検討した。以前に遺伝子ID: EHI_176590で示されるAIG1 family proteinをコードする遺伝子座を含む領域が無症候性株であるKU27で欠損していることが明らかになっている。そこでCLC genomics workbenchにより当該領域のリードマッピング状況を1198株、1446株、KU27株と比較した。Probabilistic variant detectionによりHM1株と1446株、あるいは1198株間の塩基配列での変異を検出し、amino acid changesによりアミノ酸へ二を検出した。この結果よりフレームシフト(fs)の結果を抽出したが同じ遺伝子の同数のin/delが入ると本当のfsにならず厳密にはfsの数は計算よりも少なくなる。

2) 日本の赤痢アメーバ株の比較ゲノムスから見出した病原関連遺伝子の機能解析

2-1 赤血球接着への関与の検討

1-5に記述したEHI_176590遺伝子の機能解析を行った。これまでHA-tagとの融合タンパク質としてEHI_176590を高発現させた株ではベクターコントロールと比較し、細胞表面の突起形成の促進と赤血球への接着抗進が確認されている。そこで、当該遺伝子の欠損が明らかであるKU27株と存在している二つの病原性株KU48, KU50について赤血球への接着性を検討した。

赤痢アメーバ株と赤血球を1:50の比率(1×10^5 cells: 5×10^6 cells)で混合し、OptiMEM培地で1mLとした後3000rpm, 4°Cで5分間遠心し、赤痢アメーバと赤血球を接着させた。900 μ Lの上清を除き100 μ LのOptiMEM培地に再懸濁し、氷上に30分おいた。このサンプルをスライドグラス上に置き、1サンプル当たり15枚の写真を撮影し赤痢アメーバと接着している赤血球の数を算出した。

2-2 細胞表面突起の性状解析

細胞表面から突き出る構造物は一般にアクチンフィラメントの重合により構造が保たれる。そこでHA-EHI_176590発現株で観察された突起にアクチン繊維が存在するか検討した。HA-EHI_176590発現赤痢アメーバ栄養体をスライドグラス上に固定し、抗HA抗体とアクチン繊維に結合するファロ

イジンにAlexa488を結合した試薬で細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1) 赤痢アメーバ台湾株のゲノム解析

1-1 ゲノムDNAの調製

表1 1446株、1198株からのゲノムDNA回収

strain	trial	yield (μ g)	cell number	dishes	total yield (μ g)
1446	1	9.9	5.8×10^7	36	50.6
	2	10.2	5.0×10^7	37	
	3	9.04	9.0×10^7	30	
	4	6.34	6.1×10^7	30	
	5	5.24	5.17×10^7	30	
	6	9.88	9.15×10^7	30	
1198	1	10.8	7.1×10^7	42	17.7
	2	3.86	3.42×10^7	46	
	3	3.04	2×10^7	30	

1446株、1198株からは表1にまとめたようにゲノムDNAが回収された。使用した細胞数と得られたゲノムDNA量を示す。

1-2 Next Generation Sequencer (NGS)による解析データの概要

1-1で得られたゲノムリードを整理したところ、表2、図1で示す量のデータが得られた。GC contentとPHREDスコアを示す。GC contentは既知の赤痢アメーバゲノムで示された24%に近い値であり、base callの確度を示すPHREDスコアも40程度と良好であった。

表2 1446株、1198株ゲノムデータ量のまとめ

	strains	
	1446	1198
Sequence in pairs	160,473,294	71,950,920
Total nucleotides in data set	19,890,850,273	7,142,336,398
Average size of insert	Around 8kb	250-300bp

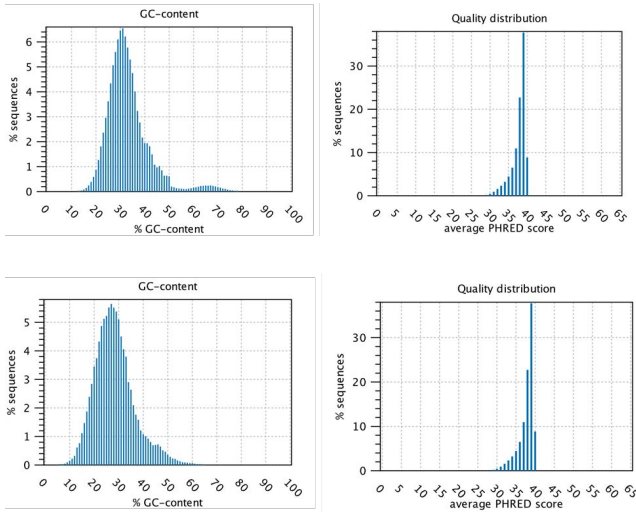


図1 1198株（上段）、1446株（下段）のゲノムリードの品質の概要。左がGC content（%）、右が各塩基の確度を示すスコア(PHRED)。

1-3 ゲノムマッピング

CLC genomics workbenchによりHM1ゲノムへマッピングを行った結果、表3に示すようにマッピングされた。

表3 1446株、1198株ゲノムリードのHM1ゲノムへのマッピング

		Count	% of reads	Avg length	No. of bases	% of base
1446株	Mapped reads	220,164,421	93.62	84.52	18,609,373,125	93.56
	Not map read	15,014,750	6.38	85.35	1,281,477,148	6.44
	Paired reads	64,816,728	27.56	7,839.97	5,748,406,759	28.9
	Broken pair rd	85,618,687	36.41	88.19	7,550,909,537	37.96
	Total reads	235,179,171	100	84.58	19,890,850,273	100
1198株	Mapped reads	68,030,660	94.55	99.58	6,774,781,100	94.85
	Not map read	3,920,260	5.45	93.76	367,555,298	5.15
	Paired reads	62,176,970	86.42	277.82	6,194,086,372	86.72
	Broken pair rd	5,853,690	8.14	99.2	580,694,728	8.13
	Total reads	71,950,920	100	99.27	7,142,336,398	100

株ともに94%のリードがマップされた。

なお、1446株のpaired readsの割合が28%と低いが、8kb先はリピート配列で位置が不確かになる問題が生じたと考えられた。Entamoebaはリピート配列が多いため、アセンブルが困難であることが分かっている。

1-4 違いのある遺伝子の抽出

表4に示すようにコード領域に存在したアミノ酸配列の変異は1446株、1198株で2504、2636箇所。

表4 アミノ酸変異を伴う変異の抽出

	strains	
	1446	1198
total difference in coding region	2054	2636
homozygotic difference	1528	1885
frame shift	54	81

これは同一遺伝子内に複数の変異がある場合もカウントされているため遺伝子数にするとこれよりも少ない。次にzygoteでhomに变異が入っているものをカウントすると、homozygoticな変異は各株で1528、1885箇所となった。これらについて、最も大きな変異となると考えられたフレームシフトを伴う変異を抽出するとそれぞれ54、81箇所であった。フレームシフトを起こした遺伝子数はそれぞれ40、57遺伝子であり、22遺伝子については両株ともに変異が確認された。

1-5 無症候性株で発見された遺伝子変異の確認

EHI_176590遺伝子についてゲノムリードのマッピング状況を比較したところ、図2に示すように1198株では存在するが1446株ではKU27株同様欠損していることが明らかとなった。

2) 日本の赤痢アメーバ株の比較ゲノミクスから

見出した病原関連遺伝子の機能解析

2-1 赤血球接着への関与の検討

無症候性株でありEHI_176590遺伝子を欠損するKU27株とそれぞれ肝膿瘍、腸アメーバ症由来でありEHI_176590遺伝子を持つKU48、KU50株について赤血球への接着性を検討した。

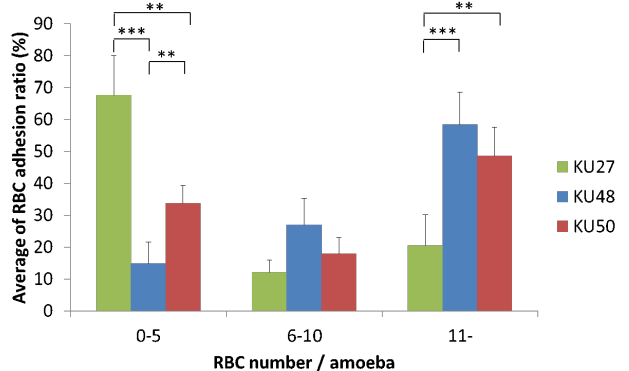


図3 KU27、KU48、KU50株の赤血球への接着性。EHI_176590を欠損するKU27は接着性が弱く、EHI_176540遺伝子を持つKU48、KU50株では11以上の赤血球を接着している細胞が多い。(**P<0.01, *** P<0.001)

図3に示すようにEHI_176590遺伝子を欠損するKU2
7株で優位に接着性が低下していることが明らか

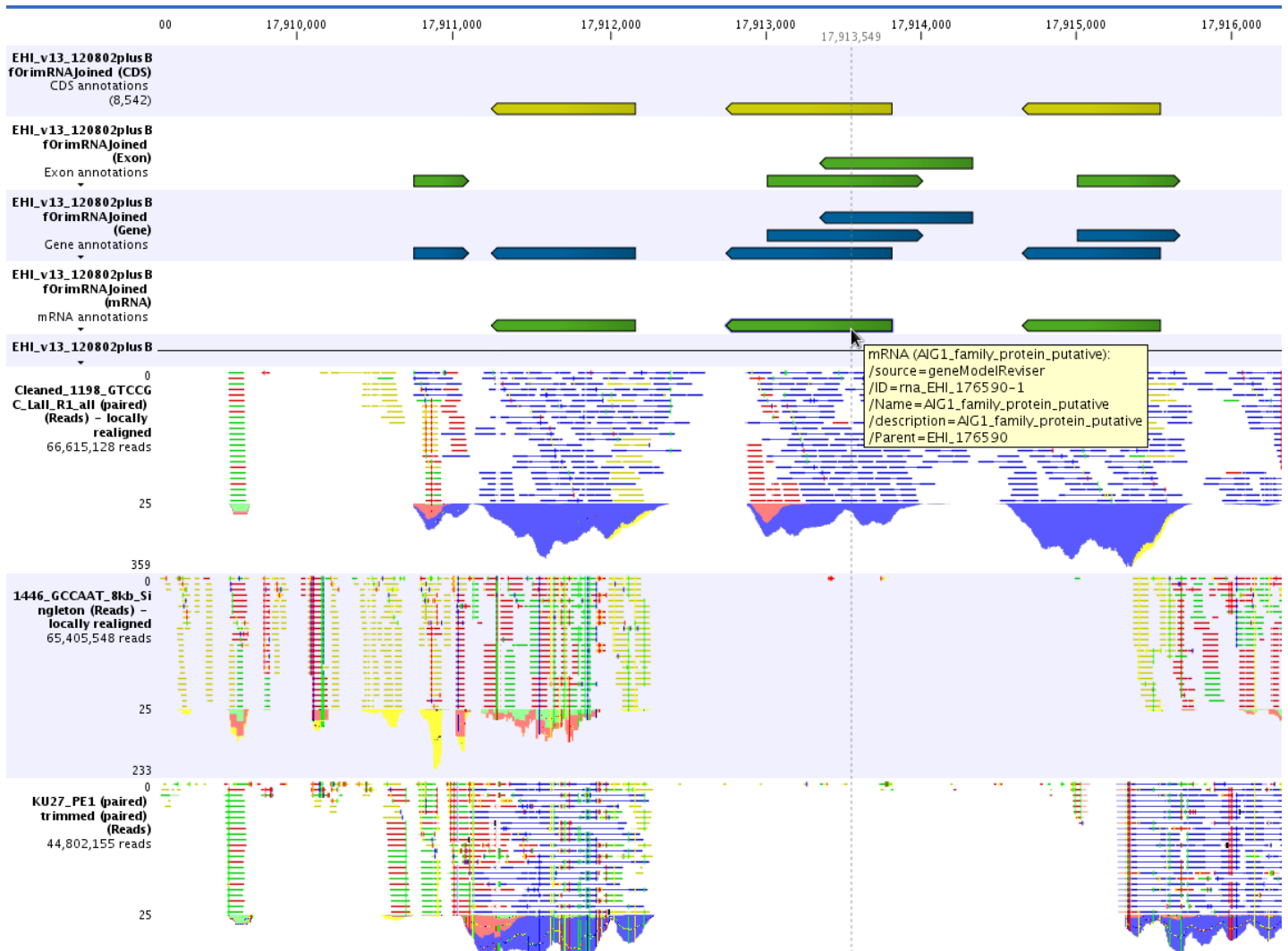


図2 1146, 1198, KU27 株における EHI_176590 遺伝子座

上段4レーンで赤痢アメーバテンプレートゲノムにおける遺伝子の位置を示す。矢印で示す ORF が EHI_176590 にあたる。下段部分上から 1198 株、1446 株、KU27 株のゲノムリードのマッ プ状況を示す。1198 株では EHI_176590 の領域にリードの横線が多数存在しているのに対し、 1446 株、KU27 株では欠損が確認される。

となった。

2-2 細胞表面突起の性状解析

HA-EHI_176590発現細胞で形成促進がみられた細胞表面の突起について、アクチン繊維の有無を検討した。

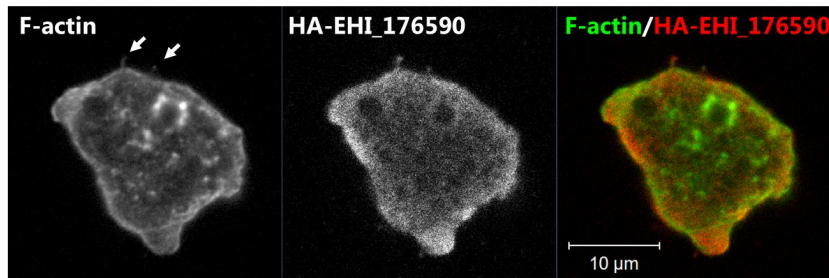


図4 HA-EHI_176590発現細胞における表面突起へのアクチン繊維の局在。

図4に示すようにのアクチン繊維が局在する突起はほとんど確認されなかった。

D. 考察

今回台湾CDCより供与された無症候性赤痢アメーバ株2株についてゲノム解析を開始することが出来た。ゲノムDNA抽出の条件検討に時間を要したが、結果としてゲノム解析に十分な量と質のデータを得ることが出来た(結果1-1, 1-2)。プレートゲノムへのマッピングについては両株とも94%程度がマップし、この2株についてHM1ゲノムとの差は同程度であると考えられた。しかしフレームシフトを伴うタンパク質コード領域への変異は1446株で54、1198株で81箇所であり、1198株のほうがタンパク質コード領域への変異が多いことが示唆された。さらに興味深いことに以前無症候性株で欠損していることが明らかとなったEHI_176590遺伝子について、ともに無症候性キャリアから回収された株であることから欠損していることが期待されたが1446株では欠損していたが、1198株では欠損がみられなかった。これまでの解析でも当該遺伝子は無症候性株の約85%で、病原株の約45%で欠損が確認されている。当該遺伝子単体で病原性を評価することは、病原性は単独遺伝子で発揮されるものではないので困難であるとしても、強い関連があることは明らかである。す

なわち当該遺伝子の変異がゲノム上の別の変異とリンクし、病原性に関わる表現型を変化させている可能性もあり、このようなゲノム変異の検出にも、今回解析を開始した株は重要な蓄積となることが期待される。

EHI_176590遺伝子の機能について、臨床株での赤血球接着性の評価と細胞表面突起の性状解析を行った。赤血球への接着抗進は以前の研究でHA-EHI_176590高発現株で観察された表現型であり、臨床株でも同様の表現型を示すことが期待された。予想通り無症候性株で当該遺伝子を欠損しているKU27では接着性が弱く、病原性で当該遺伝子を保存しているKU48、KU50株では高い接着性が本研究で示された。EHI_176590遺伝子またはそのゲノム上での有無が接着性に強く関与することが示唆された。接着性は赤痢アメーバ原虫の宿主組織への定着や栄養摂取のための貪食に重要である。今後台湾株2株についても接着性の検討を行い、EHI_176590遺伝子座の保存と接着性の関係の理解を進めたい。

EHI_176590の高発現により誘導された細胞表面突起の性状について、アクチン繊維の有無を検討した。通常細胞の形態は細胞骨格により形成・維持される。よって動物細胞に見られる糸状仮足は形態的に今回観察された突起と類似するが、内部にアクチン繊維が存在する。しかし、今回赤痢アメーバに観察された突起にはアクチン繊維の存在は観察されないことがほとんどであった。赤痢アメーバにももちろんアクチンは保存しており、宿主組織や培養プレートとの接着面への集積、貪食胞やuroid(尾部)への集積が報告されている。赤痢アメーバの細胞骨格はほとんどアクチンによって担われており、細胞質に中間系フィラメントや微小管は存在しないとされている。よって、突起形成時にアクチン繊維が関与しないとは考えにくい。少なくとも長時間存在せずともその形態を保ち、一定の機能を果たしていると考えられた。突起形成と細胞接着が相関することから、突起は接着性に関与すると予想されるが、分子機構については今後検討を行う必要がある。

E. 結論

台湾で樹立された無症候性赤痢アメーバ株2株のゲノム解析を開始した。これらの株は無症候性でありながら、以前無症候性株で欠損していることから発見された ORF を一つは保持し、一つは欠損していた。当該遺伝子の欠損を持つ2つめの株 (KU27 と 1446 株) として機能を知る重要な研究対象であることが示された。また、EHI_176590 遺伝子の細胞接着への関与が明らかとなり、その形成、維持の機構は他種生物からの知見で予想される分子機構と異なることが明らかとなった。ゲノム変異の検討とともに細胞表面突起形成・維持とその機能の解析を進めることで、赤痢アメーバの病原性に新たな分子機構を見出すことが期待される。

F. 健康危険情報

(委託業務成果報告(業務項目)には記入せずに、委託業務成果報告(総括)にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし