

審査の結果の要旨

氏名 岡田麻美

本研究は、寄生性の原生動物である赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の細胞増殖および病原性に重要な役割を担っていると考えられる食食の分子機構を明らかにするため、プロテオーム解析を用いて、ファゴソームに局在するタンパク質を網羅的に同定し、ファゴソームの成熟に伴うそれらの動態を調べた。また、赤痢アメーバの標準株および臨床分離株のファゴソームのタンパク質プロファイルと比較した。結果は以下に記した。

1. アメーバ細胞の標準株 HM1:MISS (HM1) ヘラテックスビーズを食食させ、ビーズの食食後 0、30、60 および 120 分のファゴソームをシヨ糖濃度密度勾配遠心により精製し、liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) および tandem mass spectrometry (MS/MS) により解析した結果、合計 6043 ペプチド、159 のタンパク質が同定された。検出された主なタンパク質は、小胞輸送タンパク質、細胞骨格系タンパク質、加水分解酵素、レクチン、プロトンおよびカルシウムポンプ、および、ミトコンドリアタンパク質であった。同定されたタンパク質の 67% は、ファゴソームの回収時点 (成熟段階) に特異的に検出され、これにより、ファゴソームの成熟に伴うタンパク質のダイナミックな変化が示唆された。
2. 精製したファゴソームの純度を電子顕微鏡およびイムノブロットにより解析した結果、精製ファゴソームは、細胞粗抽出液に比べ他の膜構造物の混入が比較的少なく、細胞質タンパク質は混入していないことが示された。また、ラテックスビーズへ非特異的に結合するタンパク質を LC-MS および MS/MS により解析した結果、240 ペプチド、41 タンパク質が同定された。この内、わずか 5 つのタンパク質が精製ファゴソームから検出されており、ファゴソーム分画への非特異的タンパク質の混入は、究めて低い程度であることが示唆された。
3. 同定された小胞輸送タンパク質において、Rab のプロファイルは、マウスのマクロファージのプロファイルと著しく異なっていた。また、他生物種においてファゴサイトーシス以外の小胞輸送に関わることが示されているさまざまなタンパク質が赤痢アメーバのファゴソームから検出された。これらのことから、赤痢アメーバのファゴソームバイオジェネシスにおける小胞輸送はマウスマクロファージと究めて異なっていることが示唆された。

4. 検出された加水分解酵素は、マウスのマクロファージのファゴソームプロファイルと類似したプロファイルが得られた。これらの加水分解酵素のほとんどは、ファゴソームの初期（ビーズの貪食後0分）から後期（120分）にかけて持続的に検出された。これにより、加水分解酵素は、ビーズの貪食後すぐに動員され、持続的に局在していることが示唆された。
5. ファゴソームのプロテオーム解析からミトコンドリアタンパク質である pyridine nucleotide transhydrogenase および mitochondrial-type Hsp70 が検出された。これらのタンパク質のいずれもマウスのマクロファージ、好中球、および *D. discoideum* のファゴソームからは検出されていない。赤痢アメーバにおいて、pyridine nucleotide transhydrogenase は、ミトコンドリア類似の細胞小器官であるマイトソームに局在すると考えられている。マイトソームのマーカータンパク質である cpn60 は、プロテオーム解析においても、また、イムノブロットアッセイにおいても精製ファゴソームから検出されなかった。これにより、マイトソームそれ自体がファゴソームと融合或いは物理的に相互作用しているのではなく、ミトコンドリアタンパク質が単独でファゴソームに局在していることが示唆された。
6. プロテオーム解析により検出された代表の6つのタンパク質は、間接蛍光抗体法によりビーズおよび赤血球を含むファゴソームへの局在が確認された。また、ファゴソームタンパク質の時点間における量的変化を定量的イムノブロットにより解析したところ、レクチンのサブユニットである Igl および Lgl、Rab7A、および Rab11B は、ファゴソームの成熟に伴いタンパク質量が大きく変化していることが明らかになった。さらに、GFP を付加した Rab7A を定常的に発現するアメーバ株へ青色蛍光ビーズを貪食させビデオ顕微鏡により観察した結果、Rab7A の時間特異的なファゴソームへの動員および解離が確認された。
7. さらに、赤痢アメーバの臨床分離株を用いて株間におけるファゴソームタンパク質のばらつきを調べた。臨床分離株である KU33 および HATAJI へビーズを貪食させ、シヨ糖濃度密度勾配遠心法によりファゴソームを精製し、LC-MS および MS/MS によりタンパク質を同定した。その結果、KU33 では 2866 ペプチド、117 タンパク質が同定され、HATAJI では 2717 ペプチド、116 タンパク質が同定された。得られた臨床分離株のタンパク質のプロファイルを標準株である HM1 のプロファイルと比較した結果、22%のタンパク質が3株から検出され、78%のタンパク質は、1株もしくは2株で検出された。これにより、赤痢アメーバ株間において、顕著にファゴソームタンパク質の多様性があることを示唆された。

以上、本論文は、ファゴソームの網羅的解析により、赤痢アメーバにおけるファゴソームタンパク質の全体像を明らかにし、ファゴソームの成熟に伴い、その構成因

子が質的・量的に変化することを示した。また、そのファゴソームのタンパク質プロファイルが赤痢アメーバ株間において多様性を示すことを示した。これらのファゴソームのプロテオミクスにより得られた知見は、赤痢アメーバにおけるファゴソームバイオジェネシスの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。