

情報伝達分子阻害剤による *Entamoeba* の脱嚢及び発育の抑制

牧岡 朝夫¹, 熊谷 正広¹, 小林 正規², 竹内 勤²

(¹慈恵医大・熱帯医学, ²慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)

Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by inhibitors of signaling molecules

Asao MAKIOKA¹, Masahiro KUMAGAI¹, Seiki KOBAYASHI², Tsutomu TAKEUCHI²

(¹Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., ²Dept. Trop. Med. & Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

SUMMARY

Using an axenic excystation system in vitro, we examined the effect on excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* of inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and protein kinase C (PKC), which are signaling molecules responsible for numerous cellular responses. Excystation, which was assessed by counting the number of metacystic amoebae after the induction of excystation, was inhibited by wortmannin, a potent inhibitor of PI3K, in a concentration-dependent manner. As cyst viability was not affected by this inhibitor, reduced excystation was not due to a direct toxic effect on cysts. Metacystic development, as determined by the number of nuclei in the amoebae, was delayed by wortmannin, because the percentage of single-nucleate amoebae was lower than in controls at day 3 of incubation. The PKC inhibitors staurosporine and chelerythrine chloride also inhibited excystation and metacystic development of *E. invadens* in a concentration-dependent manner. These results indicate that signaling through PI3K and PKC contributes to the excystation and metacystic development of *E. invadens*.

[目的] 赤痢アメーバのヒトへの感染は摂取された嚢子の小腸での脱嚢および脱嚢したアメーバの発育により成立する。この機構の解明は感染の理解および感染防御を考える上で重要である。今回、これらの過程に関わる情報伝達系の解析を行った。チロシンキナーゼを介した情報伝達系において重要なフォ

スファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)は、3種の phosphatidylinositol をリン酸化し、その産物がタンパク質との相互作用により、種々の細胞機能を担う。一方、プロテインキナーゼ C (PKC) は、Receptor を介した phospholipid の分解により生じた diacylglycerol により活性化され、種々のタンパク質

のリン酸化を担い、細胞の増殖・分化に関っている。今回、赤痢アメーバの脱囊・発育のモデルとして重要な *Entamoeba invadens* の *in vitro* 脱囊系を用い、PI3K および PKC 阻害剤の効果を検討した。

【材料と方法】 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) の脱囊・発育のモデルとなる *E. invadens* の系を用い、その栄養型を囊子形成液に移し3日間培養することにより囊子を形成させ、界面活性剤処理により栄養型を除き、得られた囊子を栄養型培養液に戻すことにより脱囊を誘導した。PI3K 阻害剤として wortmannin を、PKC 阻害剤として staurosporine (St), chelerythrine (Chel), calphostin C (Cal) および *D*-erythro-sphingocine (Sp) を用いた。

【結果と考察】 種々の濃度の PI3K 阻害剤 wortmannin 存在下で脱囊した metacystic amoebae 数を比較した結果、対照に比し、アメーバ虫体数の wortmannin 濃度に依存した有意な減少が認められた。阻害剤は囊子の生存率には影響を及ぼさず、囊子に対する毒性効果によるものではないことが判明した。虫体当りの核数により判定した発育に対する効果は、24 h で対照に比し、4核アメーバの割合が高く、72 h でも4核アメーバの割合が高く、1核アメーバの割合は低いという結果で、発育の阻害が認められた。次に PKC 阻害剤のアメーバの脱囊・発育に対する効果を検討した。St では1-10 nM の濃度で5 h では対照と違いはなく、それ以後対照では虫体数の増加がみられたのに対し、St 存在下では増加がほとんどみられなかった。Chel についても濃度に依存した虫体数の減少が認められた。Cal についても同様であった。これに対し、Sp では虫体数の減少は認められなかった。発育に対しては、St と Chel に抑制効果

が認められたが、Cal と Sp にはほとんど効果は認められなかった。以上の結果から、アメーバの脱囊・発育の情報伝達に PI3K ならびに PKC の関与が示唆された。赤痢アメーバにおいても、*E. invadens* と同様に、これら分子の関与が想定されることから、まず赤痢アメーバの PI3K の解析を行った。赤痢アメーバのゲノム・データベースの検索を行い、annotation data として得られた PI3K の11種 (Eh1-11) について解析した。その結果、PI3K は哺乳類においては3つのクラス (I, II, III) に分けられているが、他の生物ではクラス I および II を欠くものが多く、III は共通に存在していた。熱帯熱マラリア原虫ではクラス III のみであった。これに対して、赤痢アメーバはクラス II を欠くものの、I と III をもち、I に Eh1, 2, 4, 6, 9, 10, 11 が含まれ、III には3, 5, 8 が含まれていた。尚、Eh5 は Eh8 の一部と考えられ、Eh7 には domain が認められなかった。これらをもとにかいた系統樹から、クラス I に属する Eh1, 2, 4, 10 はクレイドを形成しており、これは他の生物のクラス I とは異なっていた。一方、クラス I に属する Eh6, 9, 11 は別の位置にあった。クラス III に属する Eh3, 8のうち、3は VPS に近く、8は TOR に近いことがわかった。脱囊過程で特にアクチン細胞骨格の再構成は必須であり、この機能に関与する脂質産物は PI(3,4,5)P3 と考えられ、これはクラス I の PI3K により形成されることから、特にクラス I に属する PI3K が重要と考えられた。

【文献】

- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S., and Takeuchi T. (2003) Parasitol. Res. 91, 204-208.
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S., and Takeuchi T. (2001) Parasitol. Res. 87, 371-375.