

システインプロテアーゼは *Entamoeba* の脱嚢及び発育に関与する

牧岡 朝夫<sup>1</sup>, 熊谷 正広<sup>1</sup>, 小林 正規<sup>2</sup>, 竹内 勤<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>慈恵医大・熱帯医学, <sup>2</sup>慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)

Involvement of cysteine proteases in the excystation and metacystic development of  
*Entamoeba invadens*

Asao MAKIOKA<sup>1</sup>, Masahiro KUMAGAI<sup>1</sup>, Seiki KOBAYASHI<sup>2</sup>, Tsutomu TAKEUCHI<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., <sup>2</sup>Dept. Trop. Med. Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

SUMMARY

We examined the effects of six cysteine protease inhibitors (Z-Phe-Ala-DMK, E-64d, Z-Phe-Phe-DMK, E-64, ALLM and cathepsin inhibitor III) on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. Excystation was assessed by counting the number of metacystic amoebae after the induction of excystation. We found that excystation was inhibited by the cysteine protease inhibitors Z-Phe-Ala-DMK and E-64d, and that inhibition was concentration-dependent during incubation. Metacystic development was assessed by counting the number of nuclei in amoeba, and was also found to be inhibited by the same protease inhibitors. The other four cysteine protease inhibitors (Z-Phe-Phe-DMK, E-64, ALLM and cathepsin inhibitor III) had a weak or little effect on the excystation, but they inhibited cysteine protease activity in the lysates of *E. invadens* cysts. During gelatin substrate gel electrophoresis, we detected broad bands with gelatinase activity of metacystic amoebae, as well as cysts and trophozoites that were inhibited by Z-Phe-Ala-DMK. There was a difference in the protease composition of cysts and trophozoites, and the protease composition of metacystic amoebae changed from cyst-type to trophozoite-type during development. These results

strongly suggest that cysteine proteases contribute to the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*, and assist the successful infection.

**[目的]** 赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)のヒトへの感染は摂取された嚢子の小腸下部での脱嚢および脱嚢したアメーバ(metacystic amoebae)の発育、大腸に下って栄養型としての生長により成立する。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。システインプロテアーゼ(CP)は消化酵素として赤痢アメーバの増殖を担うとともに、その病原性因子の一つとして重要性が明らかになっている。しかし、アメーバの脱嚢および脱嚢後アメーバの発育への関与に関しては報告がみられていない。そこで今回、アメーバの脱嚢・発育へのCPの関与を調べるため、CP阻害剤を用いて検討した。

**[材料と方法]** 赤痢アメーバの脱嚢・発育のモデルとなる *E. invadens* の系を用い、その栄養型を嚢子形成液に移し3日間培養することにより嚢子を形成させ、界面活性剤処理により栄養型を除き、得られた嚢子を栄養型培養液に戻すことにより脱嚢を誘導した。6種のCP阻害剤、Z-Phe-Ala-DMK、Z-Phe-Phe-DMK、E-64、E-64d、ALLMおよびcathepsin inhibitor IIIを用いた。

**[結果と考察]** 種々の濃度のCP阻害剤存在下で脱嚢したアメーバ虫体数を比較した結果、用いた6種のCP阻害剤のうち、Z-Phe-Ala-DMKとE-64dの存在下で、濃度に依存したアメーバ虫体数の減少が認めら

れた。一方、これらのCP阻害剤は嚢子の生存率には影響を及ぼさなかった。脱嚢したアメーバの発育をその核数により調べた結果、これらのCP阻害剤は発育も抑制することが明らかになった。一方、他の4種のCP阻害剤Z-Phe-Phe-DMK、E-64、ALLMおよびcathepsin inhibitor IIIの脱嚢抑制効果は弱かったが、嚢子の抽出液中のCP活性は抑制することができ、E-64が最も強い阻害活性を示した。E-64dはE-64の膜透過型アナログであり、嚢子壁透過により阻害効果を示したと考えられた。ゼラチンゲル電気泳動により検出された嚢子と栄養型のプロテアーゼのバンド・パターンには違いがみられ、その多くがCP阻害剤Z-Phe-Ala-DMKの存在下で消失した。脱嚢直後および発育の進んだアメーバのバンド・パターンを嚢子および栄養型と比較した結果、脱嚢直後のアメーバのプロテアーゼは嚢子タイプであるのに対し、発育の進んだアメーバでは栄養型タイプに変化していることが判明した。以上の結果から、システインプロテアーゼはアメーバの脱嚢・発育にも関与しており、ひいては感染の成立に貢献していることが示唆された。

#### [文献]

Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S., Takeuchi T. (2006) *Exp. Parasitol.*, 109: 27-32.