

セリンプロテアーゼは*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)

Serine proteases are involved in the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*

Asao MAKIOKA¹, Masahiro KUMAGAI¹, Seiki KOBAYASHI² and Tsutomu TAKEUCHI²
 (¹Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., ²Dept. Trop. Med. & Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

SUMMARY

The functions of cysteine proteases involved in the pathogenicity and differentiation of *Entamoeba histolytica* have been demonstrated, but little is understood about the functions of serine proteases (SP). This study examined the involvement of SP in amoebic excystation and metacystic development, using *E. invadens* as a model of *E. histolytica*. Four SP inhibitors (PMSF, AEBSF, TPCK, and DCI), given at different concentrations, decreased the number of metacystic amoebae in a dose-dependent manner, but did not affect the survival of cysts. PMSF inhibited not only the increase, but also the development, of metacystic amoebae. PMSF was effective in inhibiting SP activity in cystic lysates. The protease band on gelatin SDS-PAGE was weaker than controls when treated with PMSF. These data demonstrate involvement of SP in amoebic excystation and development. Searches of the genome databases of *E. histolytica* and *E. invadens* found that *E. invadens* has three types of enzymes in SP family S28, two types of S9 and one type of S24. Real-time RT-PCR revealed the expression levels of these SP mRNAs five hours after induction of excystation were higher than those observed prior to induction; an increase in expression of one type of S9 enzyme was most significant. Also, this S9 enzyme mRNA level was higher in trophozoites than in cysts. These results indicate that SP mediates the excystation and metacystic development of *Entamoeba*, and that SP mRNA levels in amoeba cysts increase after induction of excystation, especially for one type of S9.

[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。赤痢アメーバの病原性・分化におけるシステインプロテアーゼの機能に関しては明らかになってきているが, セリンプロテアーゼ(SP)の機能に関しては不明な点が多い。今回, アメーバの脱嚢・発育へのSPの関与を調べるため, まず, その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。4種のSP阻害剤PMSF, AEBSF, TPCK及びDCIを用いた。

[結果と考察] 種々の濃度のSP阻害剤存在下で脱嚢後アメーバ虫体数を比較した結果, 用いた4種阻害剤

PMSF, AEBSF, TPCK及びDCIの存在下で濃度に依存した虫体数の減少が認められた。これらの阻害剤は嚢子の生存率には影響を及ぼさなかった。また, PMSFは発育も抑制した。嚢子抽出液中のSP活性はPMSFにより阻害され, ゼラチンゲル電気泳動により検出されたプロテアーゼのバンドはPMSFの存在下で対照に比し弱くなった。これらの結果から, 脱嚢・発育へのSPの関与が示唆された。そこで, 赤痢アメーバ及び*E. invadens*ゲノムデータベースを検索したところ, *E. invadens*にはSPファミリーのうちS28, S9及びS24に属するそれぞれ3, 2, 1種類の酵素が存在することが判明した。リアルタイムRT-PCRにより, これらSPの脱嚢誘導5時間後のmRNA量を誘導前と比較したところ, すべてのSPでmRNA量の亢進が認められ, 特にS9の1種の発現量の亢進が顕著であった。さらに, このS9は嚢子に比し栄養型で最も高いmRNA量を示した。以上の結果から, SPの*Entamoeba*の脱嚢・発育への関与が判明し, 脱嚢の誘導により嚢子中のSP mRNA量の亢進が認められ, それは特にS9の1種で顕著であることが明らかになった。