

クリプトスポリジウムがコードする Sir2 の解析

安川 洋生¹, 八木田 健司²(¹富山大学大学院理工学研究部, ²国立感染症研究所寄生動物部)Analysis of Sir2 encoded by *Cryptosporidium* parasitesHiro YASUKAWA¹ and Kenji YAGITA² (¹Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, ²Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases)

SUMMARY

Silent information regulator 2 (Sir2) proteins are members of an evolutionarily conserved family of NAD-dependent protein deacetylases. By deacetylating histone and other proteins, Sir2 proteins play important roles in various biological processes, including the regulation of longevity, metabolism, and differentiation. Sir2 proteins encoded by *Cryptosporidium* parasites have no similarity with human Sir2 proteins (SIRT1). Therefore, they are attractive targets for drug therapy against infectious diseases caused by the parasites. Function of ChSir2, Sir2 encoded by *C. hominis*, was analyzed by characterizing a model organism *Dictyostelium discoideum* expressing ChSir2-GFP fusion protein. Fluorescence microscopic analysis revealed that the fusion protein was localized in *D. discoideum* nucleus. Growth of the transformed *D. discoideum* was analyzed using the real-time monitoring system (xCELLigence; Roche Diagnostics, Switzerland). Results obtained from the experiments indicated that *D. discoideum* expressing ChSir2-GFP in the medium reached higher cell density than did *D. discoideum* harboring a control vector. These results suggest that ChSir2 localizes in nucleus and plays important role in growth of *C. hominis*.

[目的] クリプトスポリジウムは、小腸粘膜の微絨毛に寄生する病原性原虫であり、免疫不全者では重篤な症状を引き起こす(五類感染症、四種病原体)。現在、有効な治療法は無い。本原虫には Sir2 が 1 種類コードされている。Sir2 はすべての生物に保存される脱アセチル化酵素であり、代謝や寿命の調節に関わることが知られている¹⁾。そのためクリプトスポリジウムにおいても重要な機能を有すると考えられる。クリプトスポリジウムの Sir2 はヒトがコードする 7 種の Sir2 (SIRT1 - 7) のいずれとも相同性が低いため²⁾、副作用の少ない抗原虫薬の標的となる可能性がある。本研究は、クリプトスポリジウムの Sir2 に関して解析し、原虫の検出や、感染症の治療に貢献することを目的とする。

[材料と方法] クリプトスポリジウム *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis* のゲノムは国立感染症研究所に保存されているサンプルを用いた。細胞性粘菌 *D. discoideum* は axenic 株である Ax2 を用いた。培養液の組成、培養方法、及び遺伝子導入法等は当研究室の方法に従った²⁾。遺伝子導入した Ax2 の増殖の観察には Roche Diagnostics 社製の xCELLigence RTCA SP を用いた。

[結果と考察] データベースに登録されている塩基配列を基にしてプライマーをデザインし *C. hominis* (3 検体)、*C. parvum* (2 検体)、*C. meleagridis* (1 検体) のゲノムを鋳型に PCR を行い Sir2 コード領域をク

ローニングし解析した。その結果、*C. hominis*, *C. parvum* 及び *C. meleagridis* の Sir2 コード領域の塩基配列は相同性が高いものの一部で異なっていることが分かった。このことは、プライマーのデザインにより種の判別が迅速かつ容易に行えることを示している。また、*C. hominis* においてはコード領域の塩基配列は検体間で完全に一致していたが、*C. parvum* については検体間で一部異なる塩基配列情報を得た。

アミノ酸配列は種を超えて非常に良く保存されており、コアドメインでは 94% 以上相同であることが分かった。

C. hominis がコードする Sir2 (本稿では ChSir2 とする) について GFP 融合タンパク質 (ChSir2-GFP) を発現する *D. discoideum* を樹立し解析を行った。蛍光顕微鏡観察の結果、ChSir2-GFP の蛍光局在は hoechst33342 染色した核に一致することが分かった。そのため ChSir2 は本来これをコードする *C. hominis* においても核内で機能しているタンパク質であると考えられる。

ChSir2-GFP を発現する *D. discoideum* の増殖をリアルタイムモニタリングシステム xCELLigence にて解析した。本システムは 96 穴プレートリーダーとコントロールユニットから成り、専用の 96 穴プレートを使用する。96 穴プレートの底面には微小金電極が配置してあり、ここに細胞を播種し、電気的インピーダンスを測定することによりリアルタイムで細胞の挙動をモニターすることができる。本システムを用いて観察したところ、ChSir2-GFP 発現株の

増殖は野生株に比べて亢進していることが示された。これは、GFP 融合タンパク質と細胞性粘菌を用いて得られた結果であり ChSir2 本来の機能を正確に反映していない可能性も有るが、ChSir2 がクリプトスポリジウムの増殖に関与していることを示唆していると思われる。

D. discoideum は5種類の Sir2 をコードしており、その内の1種 (Sir2E) は ChSir2 とアミノ酸配列に相同性がみとめられる。Sir2E は *D. discoideum* の核に局在しており、過剰に発現させた株では細胞増殖の亢進がみられた²⁾。これらは ChSir2-GFP 発現株

から得られた実験結果と類似している。従って、Sir2E は ChSir2 と同様の機能をしていると考えられ、*C. hominis* における ChSir2 の機能を知るうえで重要なリファレンスになると思われる。

[文献]

- 1) Blander, G. and Guarente, L. (2004) *Annu. Rev. Biochem.* 73, 417-435.
- 2) Katayama, T. and Yasukawa, H. (2008) *Dev. Growth Differ.* 50, 645-652.