

Entamoeba の脱嚢におけるコフィリンの発現解析

牧岡 朝夫¹, 熊谷 正広¹, 平糠 和志², 小林 正規³, 竹内 勤³ (¹慈恵医大・熱帯医学,
²京大・化学研, ³慶大・医・熱帯医学・寄生虫学)

Expression analysis of cofilins in the excystation of *Entamoeba invadens*

Asao MAKIOKA¹, Masahiro KUMAGAI¹, Kazushi HIRANUKA², Seiki KOBAYASHI³ and Tsutomu TAKEUCHI³ (¹Dept. Trop. Med., Jikei Univ. Sch. Med., ²Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.,
³Dept. Trop. Med. Parasitol., Keio Univ. Sch. Med.)

SUMMARY

Entamoeba histolytica (Eh) cysts restore motility with the induction of excystation. The amoeba moves out, passing through a small hole made on the cyst wall. Reactivation of motility and its control by actin cytoskeletal reorganization are necessary processes in excystation. This study investigated important molecules in actin cytoskeletal reorganization: actin depolymerizing factor cofilin (Cfl). In addition, *E. invadens* (Ei) was used as the excystation and development model of Eh. For this, the cysts formed in an encystation medium were transferred into a trophozoite culture medium to induce excystation. A search of the Eh and Ei genome database revealed one type for Eh (EhCfl) and three types for Ei (EiCfl-1, Cfl-2, and Cfl-3). Phylogenetic analysis revealed that *Entamoeba* Cfl formed a clade that is separate from other organisms. Immunofluorescence staining using rabbit anti-EiCfl-2 antibody and mouse monoclonal anti-actin (Act) antibody revealed that both EiCfl and EiAct proteins of trophozoites were localized immediately beneath the cell membrane. In particular, staining in pseudopodia was intense for both EiCfl and EiAct, suggesting strong implications related to amoeba motility. Actually, EiCfl and EiAct were also localized around the area immediately below the cell membrane in cysts. Real-time RT-PCR revealed that Cfl mRNA expression in cysts was remarkably lower than that of trophozoites, and that the expression of EiCfl-1 and Cfl-3 was nearly absent even in trophozoites. Higher mRNA levels were observed in all EiCfl proteins 5 hr after excystation than those observed before excystation. Furthermore, remarkably increased mRNA levels of EiCfl-1 and Cfl-3 but not Cfl-2 were observed in the presence of cytochalasin D, by which enhanced excystation was previously reported by us. These findings demonstrate increased EiCfl expression by excystation induction, EiCfl colocalized with EiAct, and close correlation between EiCfl expression and amoeba motility. In addition, enhanced excystation by cytochalasin D was closely associated with highly increased mRNA levels of EiCfl-1 and Cfl-3.

[目的] 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica* : Eh) 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成長により成立する。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。Eh の嚢子内虫体は脱嚢誘導により運動性を回復し、嚢子壁に開けた小穴から運動性を介して脱嚢することから、脱嚢時にアクチン細胞骨格の再編成による運動性及びその調節は必須であると考えられる。そこで今回、アクチン細胞骨格再編成の最重要分子の一つであるアクチン脱重合因子 (ADF) コフィリン (cofilin: Cfl) に注目し、その系統解析、局在及び発現解析を行った。

[方法] Eh の脱嚢・発育のモデルとなる *E. invadens* (Ei) の系を用い、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得、この嚢子を栄養型培養液に戻すことにより脱嚢を誘導した。大腸菌で発現させた組換え EiCfl-2 の免疫により得られたウサ

ギ抗血清及び市販のモノクローナル抗アクチン (Act) 抗体を用いた蛍光抗体法により Cfl 及び Act の局在を調べた。発現解析はリアルタイム RT-PCR により行った。

[結果と考察] Eh 及び Ei ゲノムデータベースを検索したところ、Eh には1種 (EhCfl)、Ei には3種 (EiCfl-1, Cfl-2, Cfl-3) の Cfl の存在が判明した。系統解析により、*Entamoeba* の Cfl は他の生物の Cfl/ADF とは離れた独立のクレイドを形成した。免疫蛍光染色により EiCfl 及び EiAct の局在を調べた結果、栄養型においては細胞膜直下の領域が両者ともに染色され、同じ局在を示した。特に、仮足の部分は両者ともに強く染色され、アメーバの運動への関与が強く示唆された。嚢子においても両者とも細胞膜直下の周辺部に局在がみられた。リアルタイム RT-PCR により、EiCfl 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 Cfl で mRNA 量の亢進が認められた。一方、嚢子における

Cfl の発現量は栄養型に比して著しく低く、EiCfl-1 と Cfl-3 では栄養型でもほとんど発現していなかった。先にサイトカラシンD (CD) が予想に反し、脱嚢促進効果を示すことを明らかにしたが、これと EiCfl の mRNA 量との関連について調べた。即ち、CD 存在下脱嚢誘導 5 時間後の mRNA 量を比較した

ところ、EiCfl-1 と Cfl-3 の mRNA 量が著しく増加することが明らかになり、CD による脱嚢促進との関連が強く示唆された。以上の結果から、脱嚢誘導による EiCfl の発現亢進、EiAct との共局在及び運動性との密接な関連及び CD による脱嚢促進と EiCfl-1 と Cfl-3 の発現亢進との関連が明らかになった。