

Entamoeba の4種キチナーゼ遺伝子の発現は嚢子形成と脱嚢において異なる

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 of four chitinase genes of *Entamoeba invadens* differs in the encystation and excystation

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) forms chitin-walled cysts in the encystation. The wall formation requires not only chitin synthase but also chitinase. In excystation, quadruplet metacystic amoebae emerge from the chitin-walled cysts by dissolving the wall. Consequently, chitinase function is necessary for both processes. In this study, we used *E. invadens* (Ei), a reptilian amoeba, as a model for encystation and excystation of Eh, and studied mRNA expression of chitinase (Chit) genes in those processes. Expression of three EiChits (EiChit1, EiChit2, and EiChit3) during encystation had been reported previously. We identified an additional enzyme designated as EiChit4 in the Ei genome database. We compared the primary structure and mRNA expression of these four Chits in excystation as well as the encystation using real-time

RT-PCR. Like EiChit1, EiChit4 had an 8 x Cys chitin-binding domain (CBD) and Ser-rich spacer between CBD and catalytic domain, and was closer to EiChit1 than EiChit2 and EiChit3 in a phylogenetic tree. In trophozoites, all four Chits were little expressed. During encystation, the expression of all four EiChits increased remarkably in the early phase and then decreased in the later phase. In cysts, EiChit1 was expressed predominantly; EiChit4 was at small amounts, although EiChit2 and EiChit3 were expressed little. During excystation, as assessed 5 hr after the induction of excystation, the expression of EiChit1 and EiChit4 decreased drastically, while that of EiChit2 and EiChit3 increased. Furthermore, mRNA of only EiChit2 and EiChit3 increased remarkably when the excystation was induced in the presence of cytochalasin D. These data demonstrate different expressions of four Chit genes in the differentiation of Ei.

【目的】赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*: Eh) の栄養型は宿主内で増殖し、病原性を発現するとともに、大腸を下降する過程でキチン及びキチン結合タンパク質から成る壁をもつ嚢子を形成する。これが感染型であり、嚢子壁は外界での嚢子の生存に必須である。嚢子壁の形成にはキチン合成酵素とともにキチン分解酵素キチナーゼ (chitinase: Chit) の作用も必要であることがすでに明らかになっている。一方、宿主に経口摂取された後に小腸内で起こる脱嚢においては嚢子壁の一部が破壊される必要があり、脱嚢時にも Chit の作用は必須であると考えられる。そこで今回、*Entamoeba* の Chit に注目し、その一次構造並びに嚢子形成・脱嚢誘導に伴う Chit の発現解析を行った。

【材料と方法】Eh は実験的に嚢子形成及び脱嚢を誘導できないため、*in vitro* でそれらを誘導でき、形態学的特徴と発育環が Eh と類似しているため Eh の嚢子形成・脱嚢のモデルとなる爬虫類寄生のアメーバ *E. invadens* (Ei) の系を用いた。Ei 栄養型を嚢子形成液 (低張, 低グルコース) に移すことにより嚢子形成を誘導し、2-3 日培養後嚢子を得、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。発現解析はリアルタイム RT-PCR により行った。

【結果と考察】Ei ゲノムデータベースを検索したところ、すでに同定されている 3 種キチナーゼ (EiChit1, Chit2, Chit3) に加えてもう 1 種 (EiChit4) の Chit 遺伝子の存在が判明した。EiChit1 及び EiChit4 の一次構造は N 末端から signal peptide, chitin-binding domain (CBD), Ser-rich spacer, catalytic domain から成るのに対し、EiChit2 と EiChit3 には CBD と spacer がなく、構造上の違いが判明した。系統樹を作成したところ、*Entamoeba* Chit は他の生物 Chit とは離れた独立したクレイドを形成し、EiChit1 と EiChit4 は近い位置にあった。リアルタイム RT-PCR 解析の結果、栄養型ではすべての Chit の発現が極めて低かった。嚢子形成の誘導に伴い、その初期にすべての EiChit の mRNA 量の著しい増加が認められ、後期になるとそれらの発現は低下した。嚢子では EiChit1 の発現が圧倒的に多く、EiChit4 の発現がわずかに認められた。脱嚢誘導前と脱嚢誘導 5 時間後の mRNA 量を比較したところ、EiChit1 と EiChit4 では減少し、EiChit2 と EiChit3 では増加した。さらに、cytochalasin D による脱嚢促進に関連し、その存在下で EiChit2 と EiChit3 のみ mRNA 量の増加が認められた。以上の結果から、Ei の 4 種 Chit は嚢子形成及び脱嚢の両過程において異なった発現の制御を受けることが明らかになった。