

氏名	渡邊 菜月		
学位の種類	博 士 (理学)		
学位記番号	博 甲 第 9 4 4 3 号		
学位授与年月日	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Functional Analysis of Phosphoinositides and Their Effectors Involved in Trogocytosis and Phagocytosis in <i>Entamoeba histolytica</i> (赤痢アメーバの咀嚼食・貪食におけるフォスフォイノシタイド及びエフェクターの解析)		
主査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授 (連携大学院)	博士 (医学)	永宗 喜三郎
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	稲垣 祐司
副査	筑波大学准教授 (連携大学院)	博士 (理学)	守屋 繁春

論 文 の 要 旨

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は、ヒトの大腸や肝臓に寄生してアメーバ症を引き起こす原虫である。アメーバ症の罹患数は感染地である途上国を中心に年間5000万人に及び、うち10万人が死亡するため、重要な原虫感染症の一つである。赤痢アメーバにおける貪食 (phagocytosis)・咀嚼食 (trogocytosis) は病原機構として重要である。本論文の著者は、貪食・咀嚼食による病原機構の解明を目的として、それらの制御分子として知られ、真核生物に広く存在する脂質であるフォスファチジルイノシトールリン脂質 (phosphatidylinositol phosphates, PI phosphates, PIPs) に注目し、赤痢アメーバにおけるPIPsとそのエフェクターの解析を行った。本論文はその成果をまとめたものである。

著者が研究を開始した時点では、赤痢アメーバのPIPsについては、PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃, PI3P が存在すること、これら3種のPIPsは哺乳類や酵母と同様の細胞内分布を示すことが明らかにされていた。とくに、PI3P特異的結合ドメインとして知られ、PI3PバイオセンサーであるFYVEドメインを利用したライブイメージングを用いた先行研究で、PI3Pの局在が貪食胞のみならず、咀嚼食胞にも確認されていた。しかし、PIPsの代謝・輸送・分布の全体像は未解明であり、哺乳類や酵母において保存されているPIPs結合分子の多くが赤痢アメーバで保存されておらず、PIPsシグナルの下流実行分子も未解明であった。

著者は、まず、赤痢アメーバのPIPs代謝の全体像を把握するために、PIPs代謝に関する酵素を網羅的にゲノムから探索した。その結果、赤痢アメーバではPI(3,4,5)P₃の代謝に関わる酵素群がヒトより多様化していることが明らかとなり、PI(3,4,5)P₃のシグナルとしての重要性が示唆された。そこで著者は、とくにイノシトール環3'位のリン酸化・脱リン酸化に関与する PI3-kinase と PI3-phosphatase について中心に解析した。

著者は、貪食時に特異的にPI3Pに結合する分子を特定するために、GFP-FYVEが発現誘導された場合に、PI3Pに結合することで他のPI3P結合下流分子の結合を競合的に阻害する差動結合系を確立した。この系を用いて、GFP-FYVEの発現誘導の有り・無し条件下で人為的にビーズを貪

食させ、貪食胞を精製し、貪食胞のプロテオーム解析を行った。GFP-FYVE発現によるPI3P下流分子結合阻害時に貪食胞への動員が減少するタンパク質の探索を行ったところ、94個のタンパク質がPI3P下流分子の候補となった。その中に、変化が大きいタンパク質として、リソソーム酵素受容体のエンドソームからゴルジへの逆行輸送を制御するアダプターであるレトロマー複合体を構成する vacuolar protein sorting 26 (Vps26)とVps35のホモログが含まれていた。

ヒトのレトロマー複合体は酵素受容体認識に関わるVps26/29/35と局在に関わる2分子の sorting nexin (SNX) (SNX1/2とSNX3)から成るため、著者は、ヒトSNX1を問合せ配列として赤痢アメーバゲノムを検索し、2つのSNXタンパク質(EhSNX1, EhSNX2)を発見した。さらに著者は、生化学的実験により、EhSNX1/2がどちらもPI3Pに特異的に結合すること、免疫蛍光顕微鏡観察並びにライブイメージングにより、EhSNX1が咀嚼胞形成時に咀嚼食胞杯の底部に局在し、EhSNX2は咀嚼胞が閉じ、細胞膜から分離してから後に咀嚼胞膜上に局在することを確認した。これらの結果から著者は、赤痢アメーバにおいてPI3Pを介したPIシグナリングは咀嚼食・貪食のどちらにも重要であり、EhSNX1/2は時空間依存的にPI3Pにより貪食胞・咀嚼食胞へ動員される分子であることを示した。また、Vps26, Vps35がEhSNX1を介して貪食胞へと動員されることを示唆した。

審 査 の 要 旨

本論文の著者は、赤痢アメーバの咀嚼食・貪食におけるPI3Pの重要性を示し、PI3Pの結合分子としての下流シグナル実行分子を同定し、EhSNX1/2とPI3Pによる咀嚼食・貪食の制御機構の一端を明らかにした。著者は、一連の実験を論理的に構成して厳密に進め、多角的な視点からデータを得て結論を導き出しており、生物学の成果として高く評価できる。咀嚼食・貪食の制御機構はこれまで一部の真核モデル生物でしか知られていなかったが、著者がその一端を赤痢アメーバにおいて初めて明らかにした意義は大きい。赤痢アメーバによる宿主細胞の咀嚼食・貪食は病原性の主要な部分を占めるものであるため、著者の成果は、アメーバ症の治療に繋がる基礎知見としても重要である。

令和2年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。