

## 参考資料

—臨床病理—

表2 蔗糖遠心沈殿浮遊法

〔蔗糖液(比重 1.2)〕
サッカロース(試薬 1 級) 500 g
蒸留水 650 ml
攪拌・溶解すれば比重は 1.2 になる。液状フェノールを 1% の割りに加えておけば室温で長期間保存できる。
〔手 技〕
1) 10~15ml 短試験管に約 2 ml の下痢便を採る。このとき金網製茶こしか湿ったガーゼ 2 枚で糞便を濾過して大きな夾雑物を除去する。糞便が濃くて濾過しにくい場合は水を加えて薄める。
2) 蔗糖液を 5ml ほど加えてピペットでよく攪拌する。
3) 蔗糖液をさらに加えながら攪拌し、液面が試験管口から約 1cm 下になる液量とする。あまり液が多いと遠心の際に遠心機を汚染する心配がある。
4) 遠心。2000~2500 回転(約 500×G)で 5 分。
5) 液の表面に白金耳のループ(ループの直径約 7 mm)を接触させて、液をスライドグラスに 3~4 回採り、18×18 mm のカバーグラスを載せて×400~600 の倍率で鏡検する。
6) 顕微鏡のコンデンサーの位置や絞りを調節してコントラストを付け、ピントは液の最上層、すなわちカバーグラスの下面に合わせる。
〔所 見〕
オーシストの見え方は簡易迅速蔗糖浮遊法の場合と変わらないが、視野中の夾雑物が少ないので検出は容易である。
〔注 意〕
液の表面をピペットで採取すると検出されるオーシスト数は著しく減少する。ループエーゼを必ず使用する。ループの直径が小さいと何度も採取しなければならない。電熱コイルを焼き延ばして、1ml 用ツベルクリン注射筒に巻いて作ればちょうどよい大きさになる。

表3 抗酸染色法

〔試 薬〕
1) 石炭酸フクシン液：市販のチール氏・カルポール・フクシン液(武藤化学薬品)を使用。
2) 1% メチレンブルー水溶液
3) 5% 硫酸水
〔手 技〕
1) 糞便を清浄なスライドグラスに塗抹。
2) 室温で乾燥。ヘアドライヤーの使用は冷風で。
3) メタノールで固定(2~5分)。
4) カルポール・フクシン液を塗抹面に載せて室温で染色(5~10分)。
5) 緩やかな流水で軽く水洗。
6) 5% 硫酸水で脱色(数秒~10秒程度)。
7) 水洗。肉眼的に塗抹面の赤色がほぼ消える程度がよい。脱色不十分なときは再度硫酸水で処理する。
8) メチレンブルー液で後染色(室温で 1 分)。
9) 水洗して乾燥。
10) キシレンを通し、バルサムで封入。
操作(9)のあと、塗抹面に油浸オイルを 1 滴載せ、カバーグラスをかけてすぐに観察してもよいが、永久標本として保存する場合はバルサムで封入する。
〔所見と注意〕
本文参照。蔗糖浮遊法で集めたオーシストをそのまま塗抹・染色するとオーシストは剥落してしまう。

## 参考資料

-特:108-

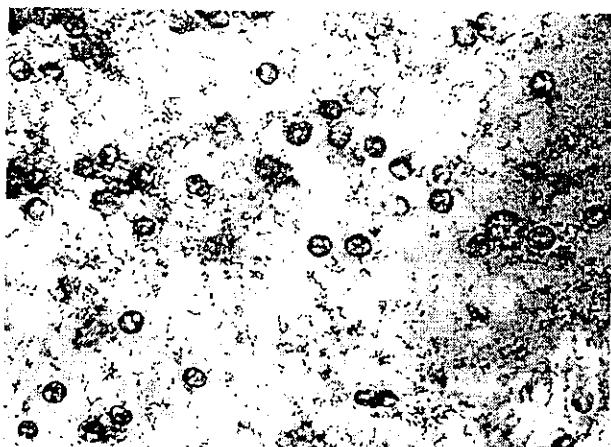


写真2 抗酸染色法によるオーシストの所見  
(巻頭カラー3頁参照)

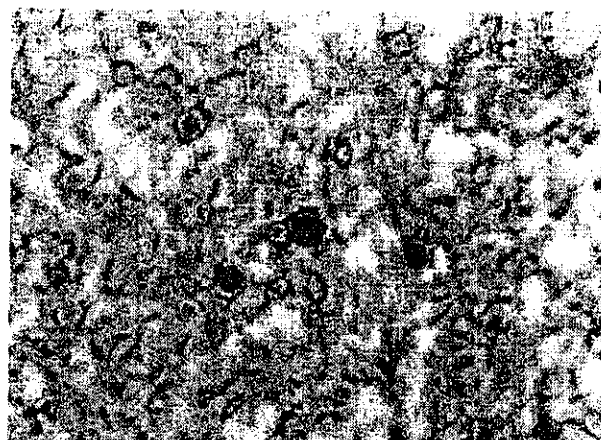


写真3 オーシストではないが抗酸染色で紛らわしく赤染する物体(巻頭カラー3頁参照)

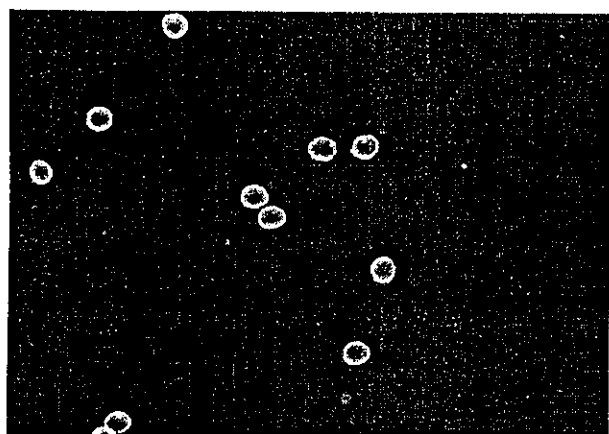


写真4 蛍光抗体法によるオーシストの所見  
(巻頭カラー3頁参照)

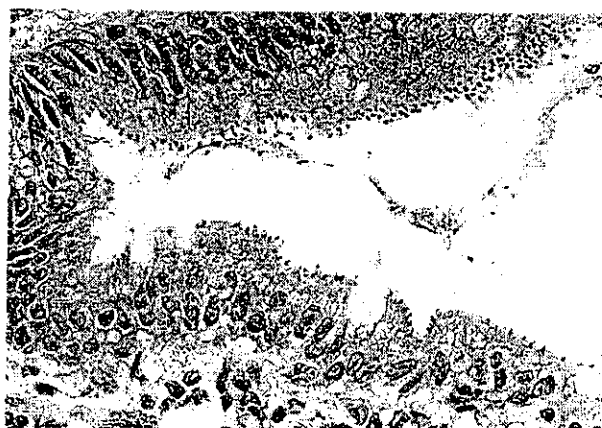


写真5 腸生検材料の病理切片H&E染色標本  
にみられる虫体(巻頭カラー3頁参照)

別が容易になる。また、永久標本として保存できる利点もある。市販の試薬で対応でき、室温で固定、室温で染色する。手技は簡単で、20~30分で結果を出せる。試薬と手技は表3に示した。以前、筆者はKinyounの石炭酸フクシン液を用いる染色法を紹介したが<sup>9)</sup>、色素液が濃厚で脱色に時間がかかるなどの難点がある。

オーシスト壁が染まるのではなく、内部のスプロゾイトや残体が赤く染まる。濃赤色から明るい赤、薄いピンクに染色されるが、まったく染まらないものも混在する。*C. parvum*のオーシストは直径約5 $\mu\text{m}$ のほぼ均一な大きさの類円形であるが、内部構造の状態によって、円形のものや中央部が白く抜けた馬蹄形あるいはドーナツ状のもの、半月形を示すものなどが見られる。また、内部に黒褐色の顆粒が1~3個存在するものもある(写真2)。1000倍に拡大

すれば不鮮明ではあるがオーシスト壁が確認できる。その直径を測ってオーシストの大きさとする。

標本によってはオーシストではない類似物が赤染することがある。これは大小不同(2~6 $\mu\text{m}$ )の円形で油滴のように無構造である(写真3)。オーシストと間違えてはいけない。

蔗糖遠心沈殿浮遊法で集めたオーシストを抗酸染色する場合は、そのまま塗抹するとメタノール固定や染色操作中にオーシストは剥落してしまう。水を入れた微量遠心管にループエーゼで液面を数回採取して遠心し、上清を捨て、再度水を加えて遠心洗浄した沈渣にアルブミンか血清を少量加えて攪拌したものを塗抹すればよい。

#### 4. 直接蛍光抗体法

オーシスト壁に対するモノクローナル抗体にFITC (fluorescent isothiocyanate) をラベルした試薬

-195-

## 参考資料

## -臨床病理-

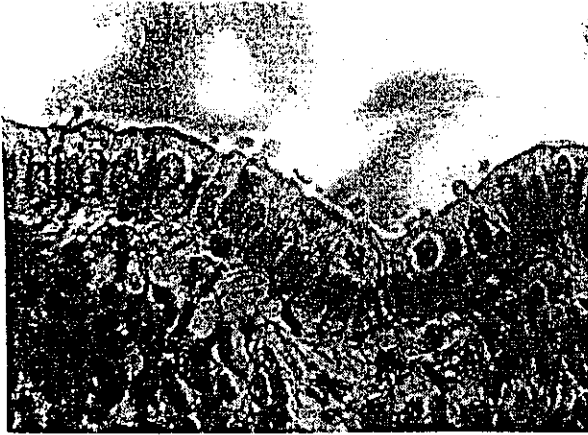


写真6 H & E 染色で虫体と粉らわしい腸刷子縁の膨化病変(巻頭カラー3頁参照)



写真7 腸パラフィン切片にみられる虫体の電顕像(巻頭カラー3頁参照)

を使って蛍光抗体法の直接法で検出する方法である。直接法なので染色時間は短く、低倍率( $\times 200$ )でも検出できるので、鏡検時間を短縮できる。抗酸染色のように類似の物体が染まることもないので、判定は容易である(写真4)。

試薬には米国で市販されているもの(Merifluor™, Meridian 社)や、国内で開発されたもの(クリプトスポリジウム検出キット, 和光純薬工業社)もある。後者は筆者の教室と共同開発したもので、*C. parvum* 以外に *C. muris* および *C. baileyi* のオーシストの検出もできる。すでに水試料からの検出用に市販されているが、現在、家畜用およびヒト用の体外診断薬としての認可を申請中である。蔗糖浮遊法や抗酸染色法ではオーシストの鏡検像に慣れないと判定に苦慮することがあるが、蛍光抗体法では誰でも自信をもって確定診断することができるので、診断薬として使用可能になれば利用価値は高いと思われる。

#### B. 胃液・胆汁・喀痰などからの検出

通常の患者ではこれらの検査材料から検出されることはほとんどないが、エイズ患者における重症例では検出される。検出方法は糞便の場合に準じて行えばよい。喀痰は粘液溶解剤で前処理する。

#### C. 生検材料からの検出

腸生検材料パラフィン切片のヘマトキシリン・エオシン染色標本では、虫体は刷子縁に付着した顆粒のように見える(写真5)。 $\times 1000$ の倍率で観察すると、各種発育段階にある虫体の核が濃染している。核が確認できない場合は虫体と判定してはいけない。微絨毛が単に膨化していたり、分泌中の粘液が粉らわしく見えることがあるからである(写真6)。

確定が困難な場合は、未染色切片を脱パラして抗クリプトスポリジウム抗体を用いて蛍光抗体染色をするか、脱パラしたあと、電顕用に固定・包埋して電顕観察で確認するのがよい。虫体であれば蛍光抗体法で特異蛍光が見られるし、電顕像では膨化した微絨毛の膜に包まれた虫体の特徴的な構造が見られる(写真7)。各種発育段階の虫体の電顕像については文献<sup>5)</sup>を参照されたい。

なお、病理染色標本で疑わしい物体が検出された場合には、糞便検査を必ず実施すべきである。

#### V. 血清抗体の検査

感染によって血清抗体価が上昇する。しかし、健康人では血清抗体が陽性を示す頃には下痢は終息するので、抗体検査による診断的価値はない。ただし、エイズ患者では抗体価が強陽性でもオーシストの排出は長期間持続する例が多い。

血清学的疫学調査には有用で、間接蛍光抗体法やELISA法などが用いられる。抗原には精製したオーシストや、濃厚感染させた動物の腸のパラフィン切片などを使用する。

筆者らの経験では、10倍や20倍程度に希釈した被検血清は大半が陽性反応を示すので、判定基準をしっかり定めないと、判断を誤ることになる。

#### おわりに

これまで、集団下痢が発生しても下痢患者が病院を受診しても、下痢の原因検索にあたって原虫検査、特にクリプトスポリジウムの検査はほとんど実施されなかった。近年、国内でもエイズ患者や旅行者下

参考資料

—特：108—

痢症における症例は増加しているし、水系集団感染も発生している。これからは届出感染症になるので、下痢便の日常検査の一つとして、どこの検査室でも是非実施していただきたい。

文 献

- 1) 井関基弘：クリプトスポリジウム症—注目される新顔の下痢起因原虫症。メディアサークル 37：11～19, 1992
- 2) 井関基弘：クリプトスポリジウム症, サイクロスポーラ症. 新興再興感染症(山口恵三, 編), 日本医事新報社, 1997. p 44～49
- 3) 井関基弘, 木俣 勲：寄生虫症と検査, a. 原虫類. 臨床病理 特集第107号(臨床検査 Yearbook '98)：119～128, 1998
- 4) 井関基弘, 高田季久：クリプトスポリジウム症の診断法の開発. 寄生虫疾患の診断法の開発と症例検討(神原廣二, 編), 医薬ジャーナル社, 1991. p 41～61
- 5) Iseki M : *Cryptosporidium felis* sp. n.(Protozoa : Eimeriorina) from the domestic cat. Jpn J Parasitol 28 : 285～307, 1979

(井 関 基 弘)

## 参考資料

ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*) 染色標本の観察京都府立医科大学医動物学教室  
塩田 恒三

## 1. メセナミン銀染色 (グロコット染色、GMS染色)

Gomori's methenamine silver nitrate (GMS) stain, Grocott's variation

GMS染色はカリニの嚢子壁および大多数の真菌類を染め出す。カリニの嚢子壁や真菌に含まれる多糖類をクロムで酸化させると遊離アルデヒド基ができる。これにメセナミン銀を反応させると銀粒子の沈着 (鍍銀) を生じ、カリニの嚢子壁 (括弧状構造物を含む) や真菌類は黄褐色～黒褐色に染まる。カリニの嚢子は球状あるいはカップ状 (特に切片で見られる) を呈し、大きさは4～8 $\mu$ mである。通常、嚢子は集塊をなしている。嚢子壁の皺は真菌類の孢子との鑑別に役立つ。括弧上構造物は ( ) 状を呈し大きさは1.5～2 $\mu$ mである。本構造物はカンジダ、アスペルギルス、コリプトコッカスなどの真菌類には認めないので、カリニとこれらの真菌類との鑑別に用いる。メセナミン銀反応時間が長すぎると、カリニの嚢子は過染して真っ黒に染まり、括弧状構造物が識別できなくなるので過染しないように時々鏡検する。

## 2. FUNGI-FLUOR KIT を用いた蛍光染色

- 1) 喀痰、吸引痰、BALFを[dithiothreitol(DTT)、SPUTSSOL]等で液化し、3000rpm、10分遠沈。
- 2) 沈さをスライドグラスに塗抹、風乾、メタノール固定5分。
- 3) 塗抹面にCellufluor solution A、約6滴を載せて1～3分染色。
- 4) 蒸留水で軽く水洗 (塗抹材料が水を含んで軟らかくなり、流れ落ちやすくなるので注意。スライドグラスは水平に近く持ち、一方の高い方の端から洗浄瓶の蒸留水を用いて染色液を低い方へ洗い落とす。
- 5) 数分静置して水分をある程度蒸発させてからカバーグラスをかける。塗抹材料が減量し観察しやすい。
- 6) 蛍光顕微鏡 (U励起; DMU) で観察。40倍対物レンズ使用、写真撮影。
- 7) カリニの嚢子はいずれも球形で大きさは約5 $\mu$ m、嚢子壁が淡青色の蛍光を発して見える。括弧状構造物が嚢子の半数以上に明瞭に認められる。嚢子の集塊が多い。嚢子の検出率はGMS染色と同等である。

## 3. ギムザ染色

ギムザ染色を施した栄養型は大きさ2～8 $\mu$ mで、赤染する1個の核 (1～2 $\mu$ m) と淡青色に染まる細胞質を有する辺縁不鮮明なアメーバ様として観察される。TEMで観察しても、栄養型は内部には1個の核と少数のミトコンドリアおよび微細顆粒を有するのみで、他の細胞内小器官に乏しく特徴的構造が見られない。故に、栄養型を臨床検査材料中に混在する種々の細胞やその変性物、出血があれば赤血球や血小板などの中から鑑別するのは困難である。しかしながら、現在一般に行われている染色法の中で栄養型を染め出すのはギムザ染色のみかもしれない。

嚢子は4～8 $\mu$ mの大きさで球形である。核は赤く染まり、未熟嚢子には1核、2核、4核のものが比較的多く、8核を数える嚢子を成熟嚢子と呼んでいる。娘細胞の形成された成熟嚢子 (カリニに特異的である) 内には、8個の核とそれを取りまく細胞質が淡青色に認められる (すなわち娘細胞)。嚢子壁はギムザ染色では染まらない。故に、嚢子が強く染まった物質で取り囲まれた状態では、嚢子壁は透明なリング状に観察される。いずれにしても、ギムザ染色においてカリニの検出を試みる場合は、染色液の濃度を濃くあるいは染色時間を長くして常法よりも数倍強く染める。



## *Entamoeba dispar*の無菌培養法の確立

竹内 勤、小林 正規、今井 栄子

慶応義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

### 研究要旨

本研究では昨年度に引き続いて非病原性といわれている *Entamoeba dispar* の無菌培養系の改良を試みた。昨年度の実験では YI-S medium が最も良好な結果を与えたため、今年度はこの YI-S medium を基礎として更に培地の改変を試み、sodium gluconate と dihydroxyacetone を加えた新しい培地 (YIGADHA-S medium) を作成してその効果を調べた結果、フォルマリン固定した *Crithidia fasciculata* あるいは緑膿菌を culture associate として添加した時、*E. dispar* は従来の YI-S におけるよりはるかに良好な増殖を示すことが明らかになった。また緑膿菌の exopolysaccharide またはアルギン酸に緑膿菌の depolymerase を添加して作成した可溶性抽出物を加えることで、3株の *E. dispar* の無菌培養が可能となった。またこの3株の *E. dispar* のうち1株は 6-phosphogluconate を加える事によっても無菌培養が可能であったが、次第に YIGADHA-S medium に適応するようになり、最終的に YIGADHA-S medium のみで無菌培養できるようになった。現在更に他の2株も同様に維持することが可能となり、増殖率も次第に良好になってきている。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：小林正規、今井栄子

### Studies on the axenic cultivation of *Entamoeba dispar*

Tsutomu Takeuchi, Seiki Kobayashi and Eiko Imai

Department of Tropical Medicine and Parasitology School of Medicine, Keio University

## 目的

以前から赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903)と呼ばれた原虫は病原性株と非病原性株に分けられる事が知られていたが、最近の研究で前者を *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911)、後者を *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925とする事が確定した<sup>1)</sup>。これに伴い両種の分布など、多くの再検討すべき事が現われたが、特に非病原性とされる *E. dispar* に関して、*in vitro* で細胞障害作用がある事が最近明らかになったので、その virulence について再度検討する必要が生じている。しかしながらこれまで *E. dispar* の virulence を確認するために必要な無菌培養系は完成されておらず、僅かに米国 NIH において1株のみ無菌化に成功したが、他の株は同様の方法によっても無菌化できず、この無菌株は本来の *E. dispar* の性質から相当 deviate しているものと推測された。また *E. dispar* を無菌化すると病原性の指標であった hexokinase などの isoenzyme pattern が変化して病原株パターンになるといういわゆる isoenzyme conversion の当否を検討するためにも *E. dispar* の無菌化は必須のものとする。更に現実には欧米では男性同性愛者間に *E. dispar* の感染が高率に拡がっており、一応免疫不全状態でも *E. dispar* 感染は無症状のまま推移するという報告<sup>2)</sup> はなされているが少数例での検討であり、まだ確実な結論を出すに至っていない。

以上のような状況を勘案するに *E. dispar* の無菌培養系の作成の意義は大きく、昨年度に引き続いて培養システムの改良を試み、予備的に実験動物に感染をも試みたので、概要を報告する。

## 方法

使用した *E. dispar* 株は昨年と同じく SAW1734R cloneAR、CYNO16:TPC、CYNO9:TPC であるが、SAW1734R cloneAR はロンドン大学の P. Sargeant より分与され、他の2株は何れもカニクイザルから Robinson medium を用いて我々の教室で分離培養されたものである。これらのアメーバ株は通常は生きている *Crithidia fasciculata* (Ref-1:PRR) を culture associate とした BI-S-33 medium で培養維持

した。混在している細菌はやはり昨年記載した方法<sup>3)</sup> で除去した。*C. fasciculata* は TTY-6B medium で維持した。

今年度は前年に使用した YI-S medium を改良した YIGADHA-S medium を基本に無菌培養の改良を試みた。この medium の組成は表1に示したが、従来の YI-S medium に sodium gluconate を 5.0g/880ml、dihydroxyacetone を 1.0g/880ml の濃度で添加し pH を 6.5 に調整後、濾過滅菌した上で YI-S medium と同様 heat-inactivated bovine serum と vitamin mixture #18 を加えたものである。この medium を使用した *E. dispar* の増殖の評価は前年度とほぼ同様に行なった。すなわち 56℃、30分間熱処理、ついで 1% 過酸化水素で 4℃、24時間処理した *C. fasciculata* 共存の BCSI-S medium で培養したアメーバを serum、vitamin mixture を含まない培地で2回洗浄後、そのまま YIGADHA-S medium にトランスファーした。培養開始時のアメーバ数は 2,000 ~ 7,000 個/ml に設定した。培養液量は 6ml とし、やはり前年度同様 13X100mm のスクリーキャップ付きバイレックス培養用試験管にて、35.5℃ で通常の気相下で実施した。アメーバの増殖は培地を 4℃ にて5分間氷冷後 invert して homogeneous にし、その 0.05ml をとって算定した。

培養したアメーバの virulence は4週令のオスハムスター(体重約40g)の肝に洗浄した *E. dispar* 50万個(0.1 ~ 0.2ml)を注射して経時的に肝膿瘍の形成をみる事で行なった。

## 結果および考察

昨年度は BI-S-33 medium、YI-S medium および我々が作成した BCSI-S medium に culture associate として 56℃、30分処理後さらに 1% 過酸化水素にて 4℃、24時間処理し、NMR 上で代謝活性を失ったと判断される *C. fasciculata* を添加して4株の *E. dispar* の無菌培養化に成功した<sup>3)</sup>。今年度はそれを更に改良して YIGADHA-S medium を開発し、完全な無菌培養株を作成することに成功した(図1)。

従来 *E. histolytica* の無菌培養に広く用いられている TYI-S medium では *E. dispar* を無菌的に培養することが困難であったため、Diamond により新たに YI-S medium がデザインされ、Clark<sup>4)</sup> はこれに

gastric mucin を加えることで1株の *E. dispar* (SAW760RRcloneA) の無菌培養株をはじめ樹立したが、これ以外の *E. dispar* 株では無菌培養が成功しなかったことから、この SAW760RRcloneA はかなり性質が deviate している事が推測されたため、我々はここ数年 YI-S medium を基礎培地としてさらに改変を試みた。その結果、その生息環境から類推されるように細菌を主たる栄養源とする *E. dispar* の増殖に細菌に特有ともいえる解糖系経路のひとつであるグルコン酸の代謝経路(エントナー・ドウドロフ或いはこれに類似する解糖系経路)が利用されているらしいことが 6-phosphogluconate を加えた培養実験(図2)から推定され、また *E. dispar* の抽出液より本経路に特徴的な酵素 6-phosphogluconate dehydratase の活性も見いだされたためグルコン酸を主な糖源とした新しい無菌培養用培地をデザインした。また dihydroxyacetone (ケト3炭糖) は緑膿菌を伴った *E. dispar* の monoxenic culture に必須な成分であったが、新たにデザインした YIGADHA-S medium においても増殖を左右する成分であることがわかった。しかし ATP 依存性の gluconate kinase 及び dihydroxyacetone kinase は *E. dispar* 抽出液からは検出されなかったためその代謝過程は不明であるが、アルギン酸(マンヌロン酸とグルロン酸からな

る糖のポリマー)に緑膿菌の depolymerase を作用させて得られる代謝物質に増殖促進効果があったことからグルコン酸に関してはアルギン酸の代謝産物として推定される 2-keto-3-deoxy-D-gluconate のようなかたちで代謝されるのではないかと現時点では推定している。

今回この YIGADHA-S medium を用いることでホルマリン固定した *C. fasciculata* 或いは同様に処理した細菌を加えた場合には従来の YI-S medium に比べても安定した無菌的な培養が可能となり増殖数も数倍から20倍にまで増加した。無菌培養も緑膿菌の exopolysaccharide あるいは上述のようにアルギン酸に緑膿菌の depolymerase を作用させて無菌的に調製した可溶性抽出物を加えることで3株の *E. dispar* (SAW1734RclAR, CYNO 16:TPC, CYNO 09:TPC) の無菌培養が可能となった(図2参照)。また CYNO 16:TPC は 6-phosphogluconate を加えることで増殖数は少ないながら無菌培養ができていた(図2参照)が、培養を続けるうち何も加えることなく YIGADHA-S medium の成分のみで増殖するようになり実際的な無菌培養法がこの時点で確立された(図1参照)。その後、CYNO 09:TPC, AS16IR の2株も無菌培養できるようになり、計3株の *E. dispar* が YIGADHA-S medium で無菌株となった。

表1 YIGADHA-S medium の組織

Yeast Extract (BBL 11928) -----	30.0 g
<b>Gluconic acid sodium salt-----</b>	<b>5.0 g</b>
<b>Dihydroxyacetone(dimer or monomer*)-1.0 g</b>	
NaCl-----	2.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -----	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -----	0.6 g
L-Cysteine·HCl (Sigma C7880)-----	1.0 g
Ascorbic acid -----	0.2 g
Ferrie Ammonium Citrate-----	22.8 mg
Distilled water-----	880.0 ml
<b>Adjust pH to 6.5 with NaOH. Filter-sterilize</b>	
Bovine serum (heat-inactivated)-----	150.0 ml
Vitamin Mixture #18-----	20.0 ml
<b>*Sigma D-7753</b>	



これらの *E. dispar* をハムスター肝に直接注射した限りでは肝膿瘍の形成は認められなかった。しかし今後種々の遺伝子改変によって免疫機能を modify した実験動物を使用して、*E. dispar* の

virulence についてより詳細に検討を加える予定である。またわが国の HIV 感染者における *E. dispar* 感染の実態の調査もてがけるべく共同研究体制をとりつつあるところである。

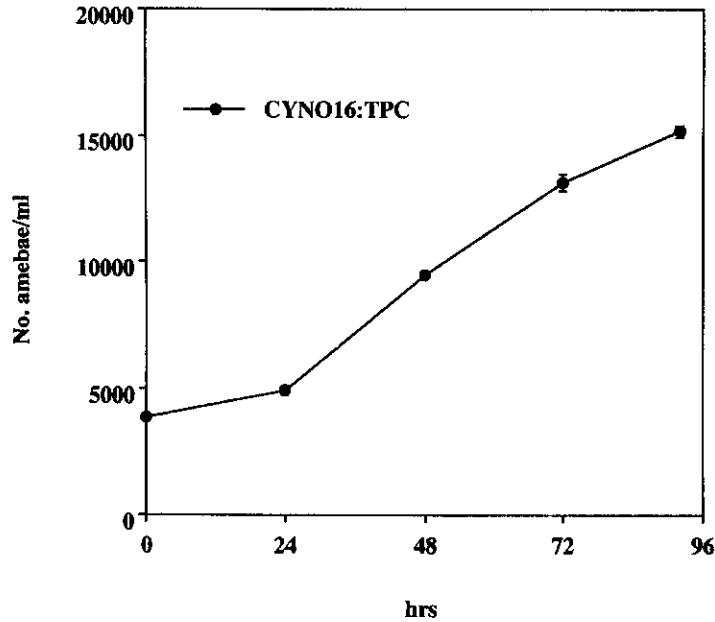


図1 Growth kinetics of CYN016:TPC (*Entamoeba dispar* cyonomolgus monkey isolate) in a new developed axenic culture medium (YIGADHA-S)

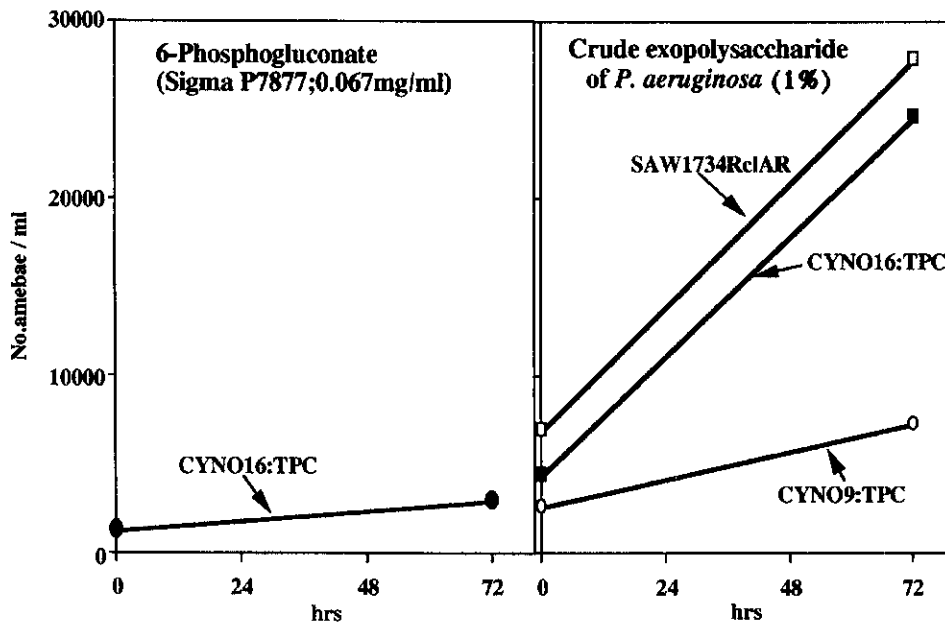


図2 Promoting effects of 6-phosphogluconate or crude exopolysaccharide extract of *Pseudomonas aeruginosa* on the growth of *Entamoeba dispar*

## 参考文献

- 1) Weekly Epidemiology Record : Amoebiasis, 72, 97-100, 1997.
- 2) Reed, S. L., Wessel, D. W. and Davis, C. E. : *Entamoeba histolytica* infection and AIDS. Am. J. Med., 90, 269-271, 1991.
- 3) 小林正規、今井栄子、橋 裕司、藤原達司、竹内 勤：不活化された*Crithidia fasciculata*存在下での*Entamoeba dispar*の培養系の作成。HIV感染症に関する臨床研究。平成9年度研究報告書。108-112, 1998.
- 4) Clark, C. G. : Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman, 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi, 1889. J. Euk. Microbiol., 42, 590-193, 1995.



## 赤痢アメーバ特異抗原のサンドイッチ ELISAによる検出

橋 裕司<sup>1)</sup>、竹内 勤<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部 感染症学部門

<sup>2)</sup>慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

### 研究要旨

赤痢アメーバ症は、男性同性愛の HIV 感染者における合併症として特に重要な疾病である。病原体である *Entamoeba histolytica* の他に、形態的に鑑別困難で非病原性の *E. dispar* もヒトに感染するため、*E. histolytica* 特異的な診断法の確立が必要とされている。そこで、*E. histolytica* の peroxidoxin を認識するマウスモノクローナル抗体(4G6)を用いたサンドイッチ ELISA による抗原検出系の開発を試みた。抗原捕捉抗体としてウサギのポリクローナル抗体を用い、検出抗体としてペルオキシダーゼ標識した 4G6 を用いた。この系では、ELISA プレート 1 穴あたり 50 個相当の *E. histolytica* 抗原でも検出可能であった。一方、*E. dispar*、*Giardia intestinalis*、*Blastocystis hominis* などでは、 $10^3$  個の栄養型虫体が存在しても陽性反応は認められなかった。赤痢アメーバ症患者の肝膿瘍液や糞便について検討したところ、調べた限り全例で *E. histolytica* 抗原を検出できた。4G6 を用いたサンドイッチ ELISA は、赤痢アメーバ症の特異的な診断法として有用であると考えられる。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：橋 裕司

### Detection of *Entamoeba histolytica*-specific antigen by sandwich ELISA

Hiroshi Tachibana<sup>1)</sup> and Tsutomu Takeuchi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Infectious Diseases, Tokai University School of Medicine and <sup>2)</sup>Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine, Keio University

## 目 的

最近わが国では赤痢アメーバ症が益々増加してきているが、注目されるのは国外感染例より国内感染例が多く、成人男性が圧倒的多数を占めていることである。その主な理由として、赤痢アメーバ症が男性同性愛者における性行為感染症として伝播していることがあげられる<sup>1,2)</sup>。さらに最近ではその中に HIV 感染者の症例が増加してきており、赤痢アメーバ症の発症が契機となって HIV 感染が判明した例も報告されている<sup>3,4)</sup>。欧米の男性同性愛者にも高いアメーバ感染率が認められるが、HIV 感染者における日和見感染症として赤痢アメーバ症は重視されていない。それは欧米の男性同性愛者に分布しているのが主に病原性のない *Entamoeba dispar* であることによる<sup>5)</sup>。

すなわち、これまでシストの形態から赤痢アメーバと同定されてきたものには、病原性の *Entamoeba histolytica* と非病原性の *E. dispar* が存在することが明らかになり、*E. histolytica* による感染が赤痢アメーバ症であり、*E. dispar* 感染のみの場合には治療の必要がないと考えられるようになった<sup>6,7)</sup>。ただし、*E. histolytica* 感染でも必ずしも発症するとは限らず、慢性化して無症状のシスト排出者となる場合があり、逆に、消化器症状を呈する患者から検出されたからといって *E. histolytica* であると断定することも出来ない<sup>7)</sup>。また、血清診断は多くの場合有効であるが、HIV 感染者では抗赤痢アメーバ抗体が検出できなかった例も報告されている<sup>8,9)</sup>。従って、*E. histolytica* 感染か *E. dispar* 感染かの鑑別は虫体の生物学的性状に基づいて行われる必要がある。

我々はこれまでに、赤痢アメーバ症の特異的な診断に応用できるようなモノクローナル抗体の作製に取り組んできた。*E. histolytica* と *E. dispar* の多数の分離株についてモノクローナル抗体の反応性を検討したところ、そのうちの4種類の抗体が両者の鑑別に特に有効であることが明らかになった<sup>10)</sup>。今回は、*E. histolytica* 特異的な 4G6<sup>11)</sup> を用い、サンドイッチ ELISA による抗原検出系について検討を行った。

## 方 法

### 1. 細胞培養

*E. histolytica* 標準株 (HM-1:IMSS, HK-9, 200:NIH, HB-301:NIH, H-302:NIH, H-303:NIH, DKB, C-3-2-1, SAW1627, SAW755CR) と *Giardia intestinalis* Portland I 株の栄養型虫体は BI-S-33 培地で無菌培養された。*E. dispar* SAW1734RclAR の栄養型虫体は *Crithidia fasciculata* の生虫体またはホルマリン固定された虫体とともに培養された。*Blastocystis hominis* の Nand II 株は ATCC の 1671 培地で細菌共棲培養された。更に、我々の研究室で Robinson の細菌共棲培地を用いて単離された *E. histolytica* と *E. dispar* が使用された。これらの単離株は PCR<sup>12)</sup> によって種が同定された。

### 2. モノクローナル抗体

細胞融合法により作製されたマウスモノクローナル抗体 4G6 はマウス腹水として得られた<sup>11)</sup>。プロテイン A を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、horseradish peroxidase で標識した。

### 3. ポリクローナル抗体

*E. histolytica* HK-9 株でウサギを免疫し、血清からプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

### 4. 臨床検体

筆者らの研究室に診断目的で持ち込まれた肝臓瘍液、糞便を使用した。*E. histolytica* と *E. dispar* の有無を PCR 法により確認した<sup>12-14)</sup>。また、臨床症状から赤痢アメーバ症とその他の疾患との鑑別が明確にできた症例の検体のみを使用した。検体は使用直前まで -80℃ で保存された。

### 5. サンドイッチ ELISA

ELISA プレートの各穴に 2μg のウサギポリクローナル抗体を含む 100μl の carbonate buffer (pH 9.6) を加え、4℃ で一晩感作した。0.05% の Tween 20 を含む phosphate buffered saline (PBS-Tween) で洗った後、1% スキムミルクで 1 時間ブロッキングを行った。各種の培養虫体抗原は 1 m M

phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)を含むPBS中で1度凍結融解した後、同様のbufferで希釈して使用した。肝膿瘍液は2mM PMSFを含むPBSで2倍に希釈して使用した。また、糞便検体は50%ウシ胎児血清、0.3%Tween 20、3mM PMSFを含むPBSで3倍に希釈したのち、400gで2分間遠心した上清を使用した。これらの抗原200 $\mu$ lを室温で2時間反応させた後、PBS-Tweenで洗浄した。さらに、100 $\mu$ lの標識4G6と室温で1時間反応させた後、PBS-Tweenで洗い、*o*-phenylenediamineで発色させた。45分後に反応を止め、490nmにおける吸光度を測定した。

## 結果

### 1. サンドイッチELISAの特異性

ELISAプレートの1穴に10<sup>3</sup>個相当の*E. histolytica* (HM-1:IMSS株)、*E. dispar* (SAW1734RclAR株)、*G. intestinalis*、*B. hominis* 抗原を反応させ、吸光度を比較した(Table 1)。*E. histolytica*では高価が認められたが、その他の虫体抗原ではPBSのみの場合と差がなく、*E. histolytica*に特異性の高いことが示された。

### 2. サンドイッチELISAの検出限界

サンドイッチELISAで検出可能な抗原量を明らかにするため、段階希釈した*E. histolytica* (HM-1:

IMSS株)抗原を用いて測定を行った(Fig. 1)。PBSで希釈した場合は0.5 $\mu$ gの抗原(HM-1:IMSS株の場合)は約25個の虫体に相当)の検出が可能であった。健康人の糞便を用いて希釈した場合でも、1 $\mu$ gの抗原(約50個の虫体に相当)検出が可能であった。

### 3. 培養虫体を用いたサンドイッチELISAの評価

*E. histolytica*の培養虫体を用いて、サンドイッチELISAが様々な株について応用可能かどうか検討した。無菌培養で維持されている10株の標準株の場合、10<sup>2</sup>個の虫体抗原があれば明瞭に検出できた(Fig. 2)。また、細菌共棲培地で培養された分離株5株の場合にも、10<sup>2</sup>個の虫体抗原を検出できた(Fig. 3)。*E. dispar* 10株では10<sup>3</sup>個でも陽性反応は全く認められなかった。

### 4. 臨床検体を用いたサンドイッチELISAの評価

臨床検体を直接用いた場合のサンドイッチELISAの結果をFig. 4に示した。アメーバ性肝膿瘍患者から採取された肝膿瘍液14例では、非アメーバ性の肝膿瘍患者の膿瘍液に比べて高い吸光度が全例で認められた。また、*E. histolytica*陽性の糞便3例(シスト陽性2例、栄養型陽性1例)も陰性対照に比べて高い吸光度が認められた。

Table 1 Mean optical densities (OD) obtained by the sandwich ELISA with intestinal parasitic protozoa

Antigen	Trophozoites/well <sup>a</sup>	OD <sup>b</sup>	P value <sup>c</sup>
<i>Entamoeba histolytica</i>	10 <sup>3</sup>	1.218 $\pm$ 0.020	
<i>E. dispar</i>	10 <sup>3</sup>	0.040 $\pm$ 0.007	<0.001
<i>Giardia intestinalis</i>	10 <sup>3</sup>	0.022 $\pm$ 0.003	<0.001
<i>Blastocystis hominis</i>	10 <sup>3</sup>	0.032 $\pm$ 0.003	<0.001
PBS control	-	0.026 $\pm$ 0.005	<0.001

<sup>a</sup> Cell lysates were used.

<sup>b</sup> Mean  $\pm$  SD of tests run in duplicate.

<sup>c</sup> t test against *E. histolytica*.

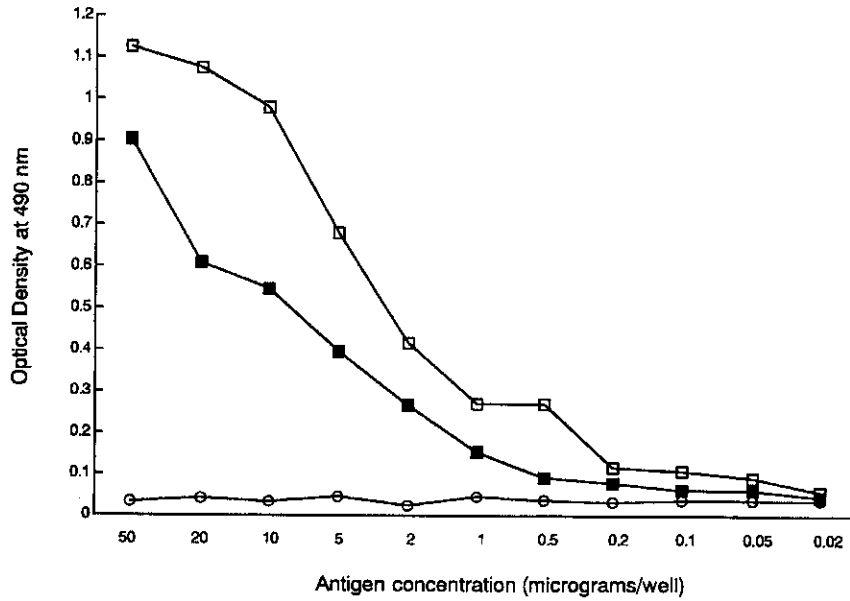


Fig. 1 Detection of *E. histolytica* antigen in PBS (□) and in fecal suspension (■) and *E. dispar* antigen in PBS (○) by sandwich ELISA.

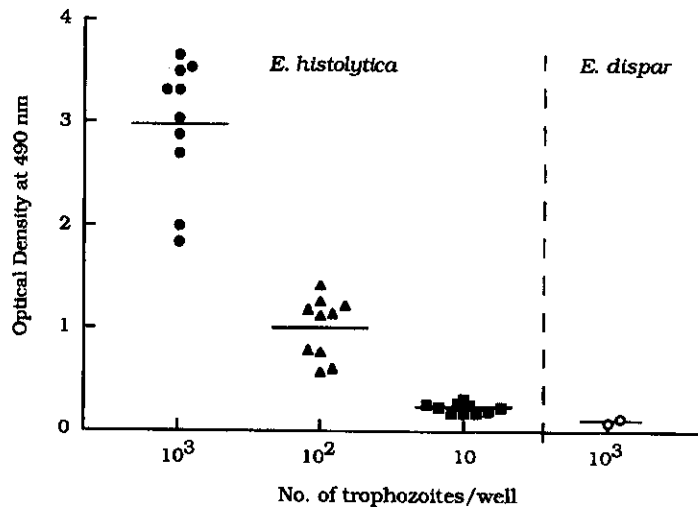


Fig. 2 Detection of trophozoites of 10 reference strains of *E. histolytica* by sandwich ELISA.

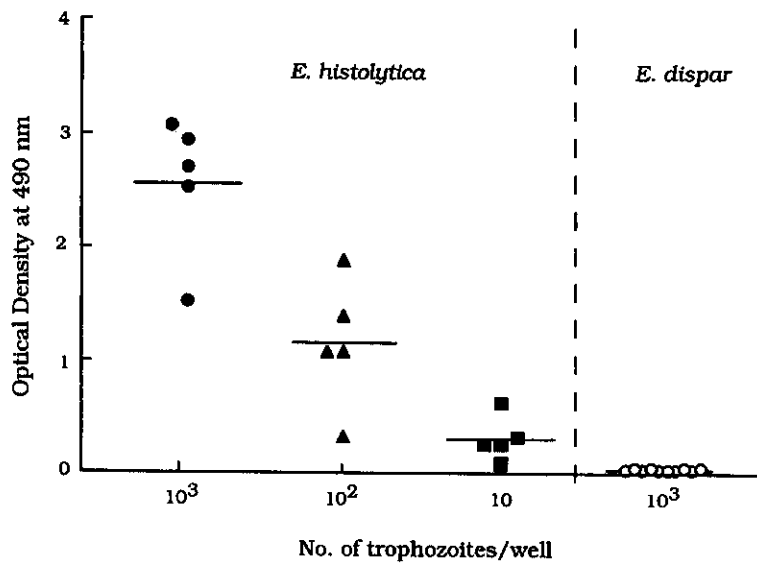


Fig. 3 Detection of trophozoites of 5 isolates of *E. histolytica* by sandwich ELISA.

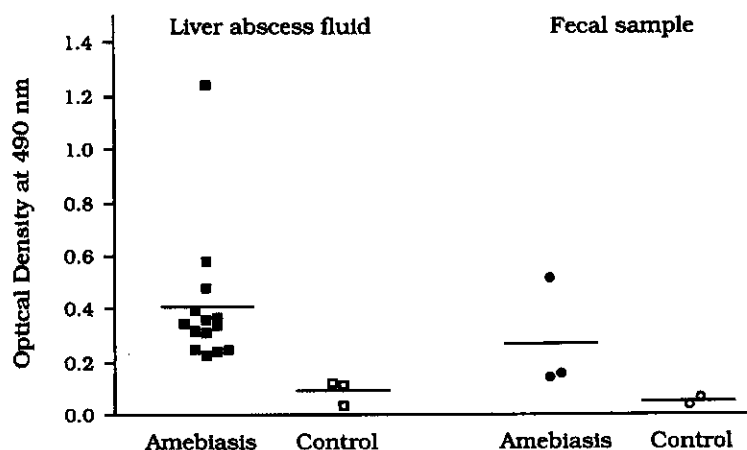


Fig. 4 Detection of *E. histolytica* antigen, by sandwich ELISA, in clinical samples.

## 考 察

4G6を用いたサンドイッチELISAは、赤痢アメーバ特異抗原の検出に有効であることが示された。4G6の反応性については、これまでに蛍光抗体法を用いて87株の*E. histolytica*と223株の*E. dispar*について検討しており、すべての*E. histolytica*株と反応し、*E. dispar*とは全く反応しないことを確認している<sup>10)</sup>。*E. histolytica*の株間では抗原性に違いのあることが知られているが、4G6が認識するエピトープは*E. histolytica*に共通に存在すると思われ、この抗体は診断に応用するのに適していると考えられる。4G6が認識する30-kDaの抗原については、過酸化水素を不活化するperoxidoxinであることが最近明らかにされた<sup>15, 16)</sup>。

糞便中の赤痢アメーバ抗原の検出については既にいくつかの報告があり、実際にキットも数種類が市販されている<sup>17, 18)</sup>。しかし、このうち*E. histolytica*を*E. dispar*と区別して検出できるキットは1種類だけである。また、Mirelmannら<sup>19)</sup>によると、このキットで明瞭な結果が得られるためには、ELISAプレート1穴に $10^3$ の虫体が含まれている必要があり、決して感度が良いとはいえない。今回我々が開発した系では1穴あたり50個の虫体が存在すればよく、感度に優れているといえる。その理由は明確ではないが、認識する抗原の局在の違いがあげられる。すなわち、これらのキットではガラクトース、N-アセチルガラクトサミン特

異的なレクチンなどの表面抗原を標的としている。これに対して、4G6が認識するperoxidoxinは細胞質や核に存在しており、表面抗原よりも豊富に存在する可能性が考えられる。また、表面抗原に対しては宿主の抗体が形成されやすいため、抗原抗体複合体が形成されてしまい、サンドイッチELISAで捕捉しにくくなっている可能性も考えられる。

糞便中に栄養型が検出された場合、虫体が赤血球を捕食していれば*E. histolytica*と推定できるが、シストのみが検出された場合は、PCRなどによって*E. histolytica*か*E. dispar*かを鑑別する必要がある。一方、肝膿瘍の場合には、膿瘍液中にアメーバ虫体を検出することが確定診断につながる。しかし、体外では栄養型は容易に死滅して活動性を失うため、検出同定が困難な場合が多い。我々はすでにPCRによるシストの鑑別や肝膿瘍液からの*E. histolytica*の検出法を報告している<sup>13, 14)</sup>。この方法は感度に優れており、有用な方法である。しかし、現時点ではDNAを精製してからPCRを行う必要があり、結果を得るまでにおよそ丸1日を要する。これに対してサンドイッチELISAでは、抗原を感作したプレートがあれば6時間以内に結果を得ることができ、手順も簡単である。また、サンドイッチELISAではPCRに比べて定量性が高く、治療効果の判定にも適していると考えられる。今回サンドイッチELISAで検討した臨床検体数は多くないものの、全例で陰性対照よりも高い

価が認められた。これらの臨床検体に実際にどれだけの抗原量が存在していたのかは不明であるが、本法が十分に実用性のある検査法であることを示していると思われる。今回開発された系を更に改良し、利用しやすいようにキット化する事が今後の課題である。

## 結 論

*Entamoeba histolytica* 特異的なモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISAによる抗原検出系について検討した。この系は感度、特異性に優れており、赤痢アメーバ症の迅速診断に応用できると思われる。

## 参考文献

- 1) Takeuchi, T., Okuzawa, E., Nozaki, T., et al.: High seropositivity of Japanese homosexual men for amebic infection., *J. Infect. Dis.* 159:808, 1989
- 2) 橋裕司:赤痢アメーバ症, *Today's Therapy* 21: 99-101, 1997
- 3) 増田剛太、根岸昌功、味澤 篤他: 赤痢アメーバ症・ジアルジア症の臨床, pp253-259, 日本の感染性腸炎II(入交昭一郎他監修)、薬根出版、東京、1996
- 4) 吉川晃司、相楽裕子: 赤痢アメーバ症で発見されたHIV感染症の6例、*感染症学雑誌* 71: 987, 1997
- 5) Burchard, G. D., Hufert, F. T. and Mirelman, D.: Characterization of 20 *Entamoeba histolytica* strains isolated from patients with HIV infection., *Infection* 19:164-169, 1991
- 6) Diamond, L. S. and Clark, C. G.: A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925., *J. Euk. Microbiol.* 40:340-344, 1993
- 7) WHO: Amebiasis, *Weekly Epidemiological Record* 72:97-99, 1997
- 8) Ohnishi, K., Murata, M. and Okuzawa, E.: Symptomatic amebic colitis in a Japanese homosexual AIDS patient., *Intern. Med.* 33:120-122, 1994
- 9) Sanuki, J., Okuzawa, E., Imai, E., et al.: Concurrent infection of homosexual men with human immunodeficiency virus and *Entamoeba histolytica* in Japan: serodiagnosis of amebic infection., *Jpn. J. Parasitol.* 44:421-425, 1995
- 10) 橋 裕司、竹内 勤:モノクローナル抗体による *Entamoeba histolytica* と *E. dispar* の鑑別、HIV感染症に関する臨床研究, pp113-119, 厚生科学研究費補助金エイズ対策研究推進事業平成9年度研究報告書、1998
- 11) Tachibana, H., Kobayashi, S., Kato, Y., et al.: Identification of a pathogenic isolate-specific 30,000-Mr antigen of *Entamoeba histolytica* by using a monoclonal antibody., *Infect. Immun.* 58:955-960, 1990
- 12) Tachibana, H., Ihara, S., Kobayashi, S., et al.: Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polymerase chain reaction., *J. Clin. Microbiol.* 29:2234-2239, 1991
- 13) Tachibana, H., Kobayashi, S., Okuzawa, E., et al.: Detection of pathogenic *Entamoeba histolytica* DNA in liver abscess fluid by polymerase chain reaction., *Int. J. Parasitol.* 22:1193-1196, 1992
- 14) Rivera, W. L., Tachibana, H., Silva-Tahat, M. R. A., et al.: Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines., *Parasitol. Res.* 82:585-589, 1996
- 15) Bruchhaus, I., Richter, S. and Tannich, E.: Removal of hydrogen peroxide by the 29kDa protein of *Entamoeba histolytica*., *Biochem. J.* 326:785-789, 1997
- 16) McGonigle, S., Dalton, J. P. and James, E. R.: Peroxidoxins: a new antioxidant family., *Parasitol. Today* 14:139-145, 1998
- 17) Abd-Alla, M. D., Jackson, T. F. H. G., Gathiram, V., et al.: Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from nonpathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces., *J. Clin. Microbiol.* 31:2845-2850, 1993
- 18) Haque, R., Neville, L. M., Hahn, P., et al.: Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits., *J. Clin. Microbiol.* 33:2558-2561, 1995
- 19) Mirelman, D., Nuchamowitz, Y. and Stolarsky, T.: Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*., *J. Clin. Microbiol.* 35:2405-2407, 1997





# 赤痢アメーバ症の診断及び治療法開発の 標的としてのアメーバ特異的システイン 生合成経路の解析

野崎 智義、竹内 勤

慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

## 研究要旨

赤痢アメーバ原虫は哺乳類に存在しない特異的なシステイン合成経路をもつ。本経路はアメーバ症の診断法並びに化学療法剤開発のための有望な標的であるとともに、本原虫のもつ抗酸素機構の中心的役割を担うものと考えられる。本年度我々は、本経路の調節機構の中心を占めるセリンアセチル転移酵素の生化学的特質を解析するべく、その遺伝子をクローニングし、組み換え蛋白を用いてその調節機構を明らかにした。その結果、アミノ酸一次配列において、挿入部位など、赤痢アメーバに特異的ないくつかの構造を示した。更に、組み換え蛋白は、細菌・植物由来の酵素とは全く異なった阻害形式を示すことが明らかとなった。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：野崎智義

**Analysis of cysteine biosynthetic pathway in *Entamoeba histolytica* as a target for the development of diagnosis and chemotherapeutics**

Tomoyoshi Nozaki and Tsutomu Takeuchi

*Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University, School of Medicine*

## 目 的

我々は昨年度より赤痢アメーバの診断及び治療法開発の標的として、赤痢アメーバ特異的システイン合成経路を解析してきた<sup>1,2,3</sup>。本年度は、システイン合成経路の調節酵素であるセリンアセチル転移酵素及びその遺伝子を解析し、その生化学的・生理学的特徴を研究することを目的とした。セリンアセチル転移酵素はアセチル補酵素Aからセリンへアセチル基を転移する酵素で、システイン合成経路の最終産物であるL-cysteineによりアロステリックフィードバックを受けると考えられる調節酵素である。我々は大腸菌のセリンアセチル転移酵素欠損株と赤痢アメーバの発現ライブラリーを用いて、機能的相補化によって、赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素cDNAを獲得し、組み換え蛋白を作成することにより、生化学的特質を明らかにすることを目的とした。

## 方 法

### 1. セリンアセチル転移酵素cDNA, genomic DNAの獲得

赤痢アメーバ株 HM1: IMSS cl 6の栄養型から分離されたmRNAを分離精製し、ZAP II フェージ (Stratagene)でcDNAライブラリーを作成した。更に、*in vivo excision*により phagemid cDNAライブラリーを作成した。このライブラリーを用いセリンアセチル転移酵素欠損変異大腸菌株のJM39/5 (F+, *cysE51*, *recA56*)の形質転換を行い、M9基礎培地、システイン非存在下で増殖したクローンを獲得し、プラスミドを分離した。

更にセリンアセチル転移酵素のアミノ末端のヌクレオチド配列は genomic DNA から *In Vitro Cloning Kit* (Takara)を用いて獲得された断片より決定された。

### 2. 組み換えセリンアセチル転移酵素の作成

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)との融合蛋白としてセリンアセチル転移酵素を発現させるべく、プラスミドを作成した。セリンアセチル転移酵素の蛋白コード領域をポリメラーゼチェーンリアクション (PCR)により増幅した。用

いたプライマー及び条件は以下の通りである。5'-ggtgatccccgacaattacatttattcaattgcac-3' 及び 5'-gacgttgatccctaaatgatggatgaattgct-3' (下線はBamHIサイトを表す)、denaturation, 94 °C 1 min; annealing, 60 °C 1 min; elongation, 72 °C 1 min; 30 cycles。約 0.9-kbの断片をBamHIで消化後、pGEX-5X-1 (Pharmacia Biotech) にクローニングし、発現ベクター pGST/SATを得た。pGST/SATで大腸菌株DH10B (Life Technologies)を形質転換し、1 mM isopropyl b-D-thiogalactosideの存在下で37°Cで2時間培養した。細胞を生理的磷酸緩衝液で洗浄した後、超音波破碎し、大腸菌の粗抽出液を得た。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/セリンアセチル転移酵素融合蛋白はグルタチオンセファロース4Bカラム (Pharmacia)で精製し、Factor Xa (New England Biolabs)で消化した後、分離精製されたセリンアセチル転移酵素を得た。

### 3. 酵素アッセイ

セリンアセチル転移酵素の活性の測定は二つの方法によって行った。第1の方法は acetyl CoA のチオエステル結合に特異的な232 nmにおける吸収の減少をモニターする方法であった。反応は100µlで、50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM acetyl CoA, 1 mM L-serine中で行った。第2の方法はシステイン合成酵素とのカップリングを用いたシステインの生成を測定する方法であった。反応は50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM acetyl CoA, 5 mM L-serine, 1 mM Na<sub>2</sub>S, 5 mM dithiothreitol, 0.01 unitの組み換えシステイン合成酵素<sup>1)</sup>を含む100µlの溶液中で行った。システイン合成酵素の活性測定は昨年度の報告書及び文献<sup>1</sup>を参照されたい。1 unitの活性は25°C 1分間に1µmoleのアセチル補酵素Aのチオエステル結合を切断する活性或いは、1µmoleのL-cysteineを生成する酵素量と定義した。

### 4. 赤痢アメーバ粗抽出液からのシステイン合成酵素・セリンアセチル転移酵素の分離

*in vivo*で両酵素が相互作用をしているかを調べるために、赤痢アメーバ粗抽出液をTOYOPEARL SW55を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより展開し、各フラクションの両酵素の活性、並び

に、蛋白濃度を測定する。

結果

5. サザンブロットによる遺伝子の構造の解析

赤痢アメーバゲノム DNA を種々の制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動で分離、ナイロン膜に転写した後、<sup>32</sup>Pラベルしたセリンアセチル転移酵素 cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。

1. セリンアセチル転移酵素 cDNA, genomic DNA の獲得

5 個の cDNA クローンがレスキューにより獲得され、すべてのクローンは重なり合う領域において同一であった。cDNA 及び genomic DNA の配列からすべてのフレームにおいて stop codon に先行される長さ 918-bp の蛋白コード領域が認識された。この open reading frame は推定分子量 34404 Da、pI 6.63 のポリペプチドをコードしていた。

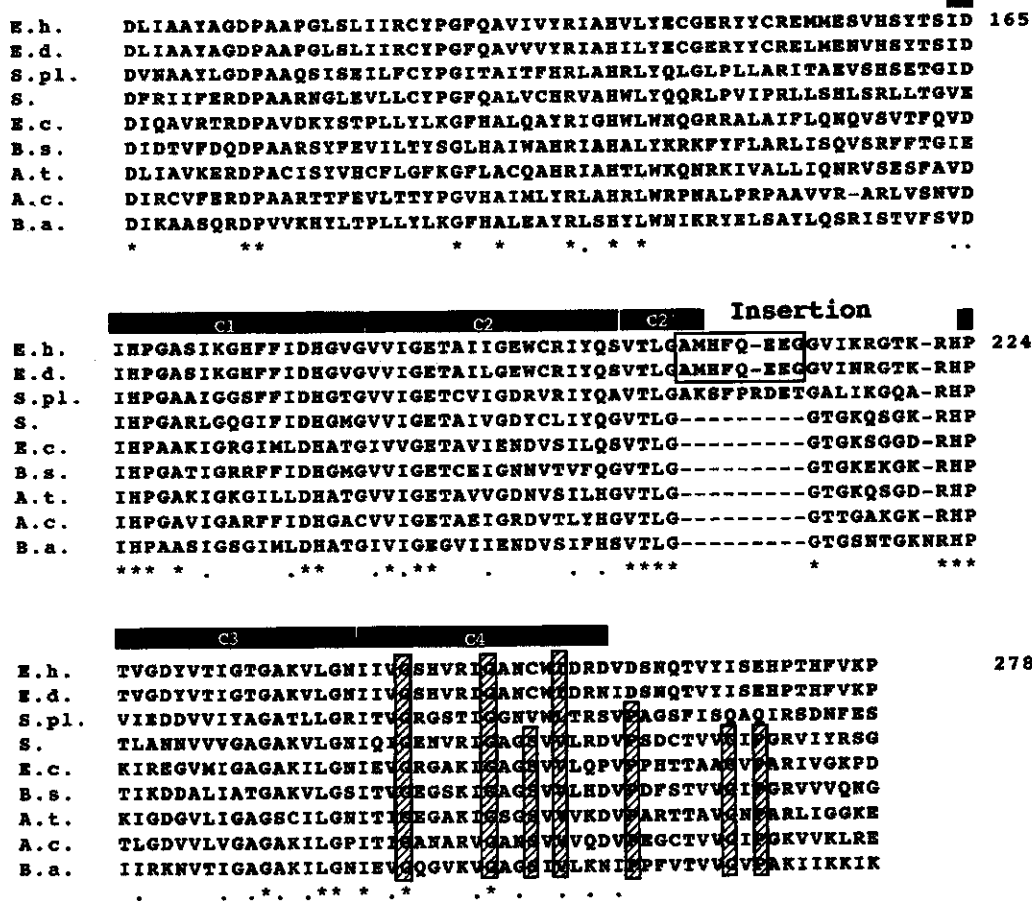


図 1 *E. histolytica*, *E. dispar* 及び他種の生物由来のセリンアセチル転移酵素のアミノ酸配列の比較 (保存性の高い領域のみを示す)

E.h., E.hSAT; E.d., E.dSAT1; S.pl., *Synechococcus* sp. (plasmid-born, srpH, accession number U23436); S., *Synechocystis* sp. (D90912); E.c., *E. coli* (M15745, M34333, U00039, AE000438); B.s., *Bacillus subtilis* (L14580, D26185, Z99104); A.t., *Arabidopsis thaliana* (L42212, L34076, Z34888); A.c., *Azotobacter chroococcum* (M60090); B.a., *Buchnera aphidicola* (M90644). アスタリスク(\*)は同一のアミノ酸を表す。点(.)は性質の似通ったアミノ酸置換を示す。アメーバ由来のセリンアセチル転移酵素に特異的な挿入部位は box で囲み、"Insertion" とマークした。斜線入り box はアセチル補酵素 A のアセチル基部分の結合に関与すると思われる保存性の高い残基を示す。赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素と高い相同性を示す酵素で結晶構造の明らかになっている UDP-N-acetylglucosamine 3-O-acyltransferase (LpxA) のヘキサペプチドの構造モチーフ (coils 1-4) を配列の上に塗った四角で示す。

## 2. セリンアセチル転移酵素のアミノ酸一次配列における特徴

獲得された赤痢アメーバセリンアセチル転移酵素遺伝子のコードする蛋白は多くの種由来のセリンアセチル転移酵素と相同性を示した(図1)。特に、catalytic domain X及びYは36-52%の同一性を示した。他種のセリンアセチル転移酵素のうち、最も高い同一性を示したのは藍藻類に属する *Synechococcus* 及び *Synechocystis* であった。*Synechococcus* には染色体上及びプラスミド上に2種類のセリンアセチル転移酵素遺伝子を有するが、興味深いことに、プラスミド上にコードされたセリンアセチル転移酵素(srpH)が赤痢アメーバのそれと最も高い同一性(52%)を示した。

セリンアセチル転移酵素を含めた多くのアシル及びアセチル転移酵素に保存された left-handed parallel beta helix 構造は赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素においても保存されていた。しかしながら、赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素には他種に見られない挿入部位が存在した。この挿入部位は *Synechococcus* のプラスミド上にコードされたセリンアセチル転移酵素にも見られた。多くの生物由来のセリンアセチル転移酵素におい

て完全に保存されていて、アセチル補酵素Aの結合に関与すると考えられていた残基のいくつかは保存されておらず、これは *Synechococcus* の srpH でも同様であった。以上の結果は蛋白全体としてのアミノ酸同一性の高さとともに、赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素が *Synechococcus* のプラスミド上のsrpH遺伝子、或いはその関連遺伝子をその祖先としている可能性を示唆している。

## 3. 組み換えセリンアセチル転移酵素の生化学的特徴

組み換えセリンアセチル転移酵素はアセチル補酵素Aに対して  $K_m=0.2 \pm 0.05$  mM、L-serine に対して  $0.4 \pm 0.2$  mMを示した。これは細菌及び植物由来のセリンアセチル転移酵素と比較的近かった。赤痢アメーバのセリンアセチル転移酵素の最も重要な特徴はその活性がシステイン合成経路の最終産物である L-cysteine により阻害を受ける点であった。L-cysteine濃度を変化させたLineweaver-Burkプロットによると(図2)、L-cysteineはL-serineに競合的にセリンアセチル転移酵素を阻害した。L-serine に対する  $K_i$  は  $3.5 \pm 1.0 \mu\text{M}$ であった。しかしながら、生理的 L-serine 濃度下(3.4-5 mM)では

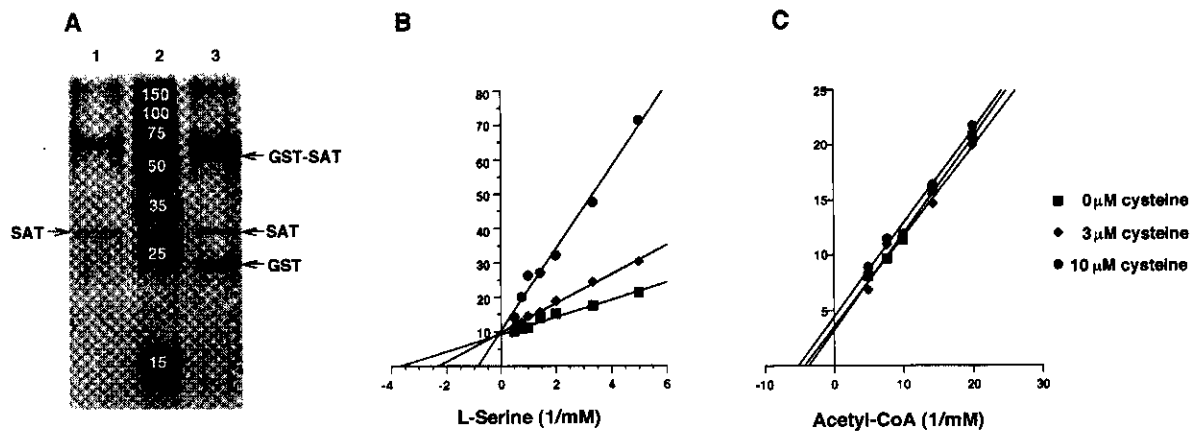


図2 組み換えセリンアセチル転移酵素の精製とL-cysteineによる阻害を示すLineweaver-Burkプロット

(A) 部分精製された組み換えセリンアセチル転移酵素及びグルタチオンセファロース4Bに結合した蛋白分画のSDSポリアクリルアミドゲルをクマシー染色した。レーン1, GST-EhSAT融合蛋白をグルタチオンセファロース4Bに結合し、Factor Xaで切断後、溶出した。レーン2, 蛋白スタンダード。レーン3, 溶出後、グルタチオンセファロース4Bの担体をSDS処理した。融合蛋白、GST部分、セリンアセチル転移酵素の泳動部位を矢印で示した。

(B、C) 精製された酵素のカイネティクスは、アセチル補酵素Aのチオエステル結合の開裂による232nmの吸収の減少で測定された。反応速度は固定されたアセチル補酵素A(0.2 mM, B)及びL-serine (5mM, C)濃度が0、3、10  $\mu\text{M}$ のL-cysteineの存在下で測定された。