

目的

HCMVはHIV感染者において重篤な感染症を発生するが、その診断はしばしば困難である。さらに現在治療効果の判定に役立つ指標も少ない。PCR法を用いた血中のHCMV DNAの定量が、HCMV感染症の診断、経過観察に有用であるかどうかについて、定量されたDNA量と臨床経過との関連から検討する。

方法

HIV患者40人、健常人26人から血液を採取し、全血中のDNAを抽出した。HIV患者の内訳は、治療中にもかかわらずHCMV網膜炎の悪化を認めていた3例と、HCMVに対する治療を受けていない37例である。抽出されたDNAについて、HCMVゲノムのopen reading frame US17をターゲットとし、PCR反応を行った。Perkin-Elmer Applied Biosystems社のABI PRISM™ 7700 Systemを用い、

PCR増幅産物中の蛍光色素からの光量を測定することにより、全血中のHCMV DNAコピー数を算出した。PCRの反応条件は50℃2分、95℃10分、95℃15秒と61℃1分を50サイクル、である。なお、サブクローニングしたHCMVゲノムのDNA断片の希釈系列を作成し、定量の際のスタンダードとして用いたが、200コピー/mL以下は再現性が低くなることから、200コピー/mLを検出感度と設定した。このようにして測定されたDNA量と、CD4⁺リンパ球数およびHCMV感染症の有無について比較した。

結果

HIV患者40人のうち28人からHCMV DNAが検出された。CD4⁺リンパ球数が100個/μL以上の例は100個/μL未満の例に比べ、明らかにDNA量の低い例が多かった(図1)。

HCMV網膜炎6例、肺炎1例、食道炎1例(計8例)並びにHCMV副腎炎疑診例2例はいずれも

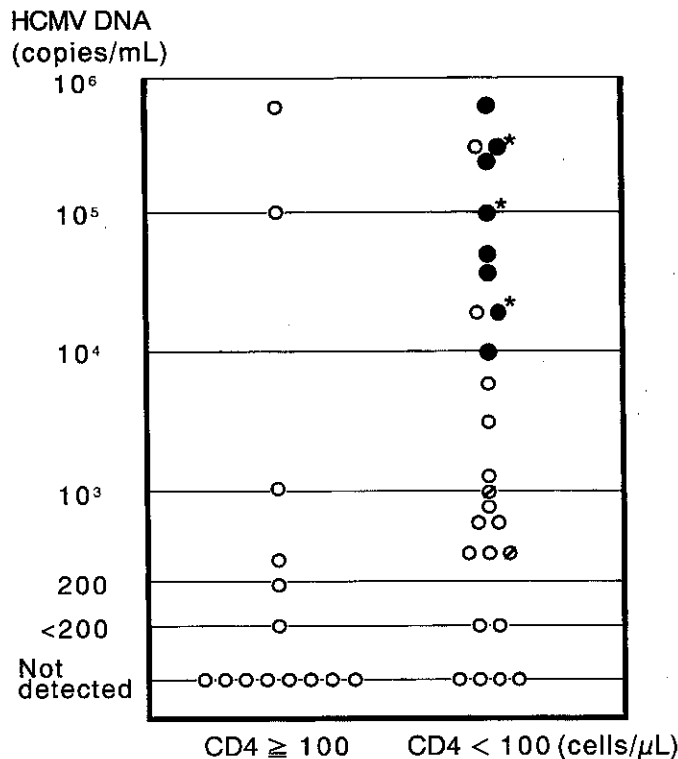


図1 HCMV DNA量とCD4⁺リンパ球数との関係

- : HCMV感染症診断例
- : HCMV副腎炎疑診例
- : HCMV感染症を認めなかった例
- *: 治療中にもかかわらずHCMV網膜炎の悪化を来した例

CD4⁺リンパ球数100個/μL未満であり、加えて診断例8例ではHCMV DNA量が全例 1×10^4 コピー/mL以上であった。一方、CD4⁺リンパ球数が50個/μL以下の例に限ってDNA量と感染症の有無との関係を見ると、DNA量が 1×10^4 コピー/mL以上の9例中8例がHCMV感染症の診断に至っていた。健常人については全員が検出感度以下であった。

さらにHCMV食道炎の患者のDNA量を経時的に測定したところ、治療前 6×10^5 コピー/mLであったDNA量は、ganciclovirの投与後臨床症状の改善と共に、 5×10^3 コピー/mLまで低下した。しかしこの時点でganciclovirの投与を中止したところ、DNA量は 1×10^4 コピー/mLとなり、間もなくHCMV腸炎の発症をみた。ganciclovirの再開後、腸炎は改善しDNA量も検出感度以下まで低下したが、他のHCMV患者においても同様にHCMVに対する治療が奏功した後は、DNA量は200コピー/mLないしそれ以下まで低下していた。

考 察

HCMVは、特にCD4⁺リンパ球数が極度に低下したHIV患者において、重篤な感染症を発症する。従来よりHCMV感染症の診断、予知、治療効果の判定に有用な指標が求められてきた。PCR法によるHCMV DNAの検出もその一つだが、単に検出だけでは必ずしもHCMV感染症の活動性を反映しないため、定量的な測定が必要とされてきた¹⁾。

今回の検討では、特にCD4⁺リンパ球数が50個/μL以下の患者において、HCMV感染症は 1×10^4 コピー/ml以上のDNA量と非常に良い相関関係を示していた(感度100%、特異度90%)。これによりCD4⁺リンパ球数が低値である患者では、HCMV感染症の診断に 1×10^4 コピー/mL以上のDNA量が一つの目安となる可能性が示唆された。さらに治療効果の判定、経過観察においても、DNA量の測定が有用である可能性が示された。real-time PCR法は従来の定量的PCR法に比べ、蛍光プローブから発する光の量から客観的に定量できること、PCR反応後に検体を扱う手間が要らないことから、簡便性、迅速性、再現性に優れている²⁾。この点においてもreal-time PCR法によるHCMV DNAの定量は有用であると考えられる。

結 論

real-time PCR法により測定した全血中のHCMV DNA量は、HCMV感染症の診断、経過観察に有用である。特にCD4⁺リンパ球数が50個/μL以下の患者においては、HCMV DNA 1×10^4 コピー/mL以上がHCMV感染症の診断の一助になる可能性がある。

参考文献

- 1) Boeckh,M.,Boivin,G.:Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications., Clin Microbiol Rev. 11:533-554, 1998.
- 2) Heid,C.A.,Stevens,J.,Livak,K.J.,et al.:Real time quantitative PCR., Genome Research.6:986-994, 1996.
- 3) Ljungman,P.,Plotkin,S.A.:Workshop on CMV Disease; definitions, clinical severity scores, and new syndrome., Scand J Infect Dis.99 (Suppl):87-89, 1995.

分担研究報告書

E. 日和見合併症の新しい診断法の開発



Entamoeba dispar の無菌培養法の確立

竹内 勤、小林 正規、今井 栄子

慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

研究要旨

本研究では初年度よりヒトに対して病原性を示さないと云われている *Entamoeba dispar* 栄養型虫体の無菌培養系の確立を試みてきた。昨年度は YIS-medium を基礎として、sodium gluconate と dihydroxyacetone を添加して作成した YIGADHA-S medium に更に 6-phosphogluconate などを加えて安定した増殖を数株の *E. dispar* について得る事ができたが、増殖率は種々の実験に使用できるほどのものではなく、改善が必要であった。今年度は以上の成果を基に培地の改変を試み、まず従来 culture associate として知られていた *Pseudomonas aeruginosa* や *Escherichia coli*、あるいは *Crithidia fasciculata* だけでなく、spider wort(ツユクサ)などの植物を破砕して得た細胞を添加すると良好な増殖が得られたことから、植物の代謝系に特徴的な iron-sulfur protein であるフェレドキシンを加えるとこれまでで最も安定した増殖が得られる事が明らかになった。今回の培養系によって $10^3/\text{ml}$ の *E. dispar* 5 株が 72 時間後には $10^5/\text{ml}$ にまで増殖し、確実に継代培養できることも明らかになった。この培養系によれば *E. dispar* を大量に培養し、種々の実験に応用できるものと考えられた。

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

従来赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903)と呼ばれた原虫は病原性である *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911)と非病原性である *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925 とに分けられる事が近年の研究で確定したり。これに伴って、両アメーバの疫学や臨床的側面で多くの再検討を要する事項があらわれた。特に最近 *in vitro* で *E. dispar* が弱いながら細胞障害作用を示すことが明らかになり、宿主側の免疫状態如何によっては何らかの virulence が観察され得るものと想定されるに至っている。一方欧米の同性愛行為由来の AIDS 患者では *E. dispar* 感染が多く見られるが、これまでの少数例の検討では virulence が確認されておらず²⁾、エイズ患者では臨床症状とアメーバ感染との間に相関関係は見られず、また分離株も Sargeant らのアイソザイムパターンでの判定によれば非病原株、すなわち *E. dispar* と判定された。このような所見から判断するに免疫不全であっても、*E. dispar* は症状発現に寄与していないと判断される。しかし、この検討は上述のごく少数例について行なわれたものであり、実際のところ *in vitro* で観察された細胞障害作用が宿主が免疫不全の場合どのような形で現れるのか、又は全く現れないのかについての検索は今後の問題として残っていると云わざるを得ない。また *E. dispar* 自身の生物学的研究や、その他多くの研究が遅れているという状況をも考えあわせると、確実な他の細胞、代謝系の影響のない *E. dispar* の無菌培養系の作成が寄与するところははなはだ大きいと云う事ができる。これまでには僅かに米国 NIH において casein-free の YI-S medium を使用して1株のみ *E. dispar* の無菌培養に成功している³⁾が、同じ培養液を使用しても他の複数の供試株については全て失敗という結果になっている。従って無菌培養が成功したこの1株(strain SAW1734R cloneAR)の *E. dispar* がかなり deviate している株ではないかと云う推測も当然の事ながらなされている。

以上のような状況のもと、本研究では *E. dispar* の確実な無菌培養系の作成と種々の実験的な免疫不全状態下での virulence の有無に関して検討を行

なってきたが、今回ようやく蛋白精製やアメーバの細胞そのものを使用した実験などにまで応用可能な無菌培養系を作成できたので、その概要を報告したい。

方 法

今回の実験では5株の *E. dispar* を使用した。すなわち SAW1734R cloneAR、AS21R、AS161R、CYNO09:TPC、CYNO16:TPCである。これらの株のうち SAW1734R cloneAR はロンドン大学の P. Sargeant より分与され、CYNO06:TPC と CYNO16:TPC はカニクイザルより Robinson's medium を用いて我々の教室で分離された。AS21R、AS161R はイランでヒトから分離された株で、当初は Robinson's medium で維持されていたものを、われわれの研究室で *Crithidia fasciculata* を associate とした monoxenic culture に改変した。以上の分離株は全て無菌培養化の実験に供する前は通常 viable な *Crithidia fasciculata* (Ref-1:PRR) を culture associate とした BI-S-33 medium で維持した。混在している細菌は一昨年本研究班報告した方法で除去している。*C. fasciculata* は昨年同様、TTY-6B medium にて維持、増殖せしめ、実験に供した。

今年度は昨年開発した YIGADHA-S medium⁴⁾ を基本にして、増殖因子を更に探索していくと云う形をとった。この培地にアメーバをトランスファーする際も昨年度と同様の方法によった。すなわちまず熱処理、過酸化水素処理を行なった *C. fasciculata* 共存下で BCSI-S medium にて数代維持したアメーバを血清、vitamine mixture を含まない培地で洗浄したのち YIGADHA-S medium にて培養した。培養液量、培養条件、増殖の検定法などは昨年の報告と同様である。

今回は特に増殖因子として種々の植物細胞を選択して実施してみた。その理由はこれまでの *E. dispar* の培養時の culture associate として有効であった細胞が細菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) から、種々の原虫 (*C. fasciculata*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Acanthamoeba castellanii*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus*)、マウスマクロファージ株 (P388D1 cell line) など多岐に渡ること、及びもし植物細胞も有効であれば、*E.*

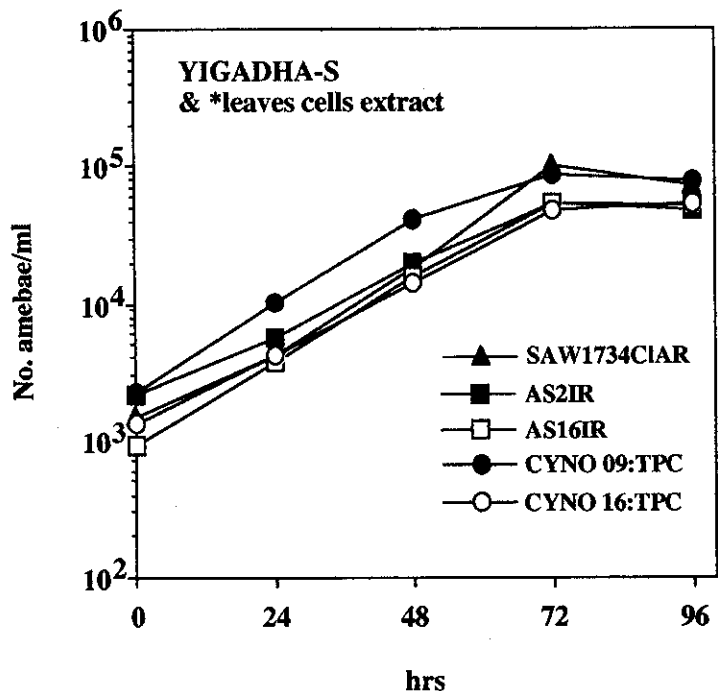
dispar の増殖に良好な影響を及ぼす物質あるいは代謝系の特定化がより容易になると想定されたからである。この考えは従来の *E. dispar* の無菌培養の試みの基本的な phagocytosis そのものが何らかの *E. dispar* 増殖に対して有効な作用を及ぼしているという考えとは異なっている。

対象とした植物からは基本的に葉を採取し、少量の RPMI1640 を添加したのちに乳バチにて磨り潰し、それに適量の RPMI1640 を加え植物細胞の suspension とした。この suspension を遠心して数回洗い、最終的に pellet の wet volume の 20 倍量の RPMI1640 を加えて suspension とした。この suspension を 30 分間音波破碎し、得られた extract を 15,000g で 30 分間遠心し、上清を得た。この上清はミリポアフィルターを通して通常の手法で濾過滅菌を行い、得られた濾液の増殖促進効果を見た。

結果及び考察

今年度の実験では上記の理由からまず植物細胞に注目して、種々のもの(cherry, morning glory,

arrowroot など) を検討したが、磨り潰す段階で最も細胞が intact に保たれているのが形態学的観察によればツユクサ(spider wort)であったので、以後の実験ではこれを主に使用した。まず当初はツユクサを始めとする植物の葉の破碎液液中の細胞数を算定し、 $1 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ くらいになるように調製し、 121°C 、15 分間オートクレーブにかけて後に *E. dispar* を含む YIGADHA-S medium に添加したが、*E. dispar* に対する増殖促進効果がある程度見られたものの不安定であり、なおかつオートクレーブにかけたとは云え、細胞をそのものを使用していたため、上記のように植物細胞を suspension としたのち音波破碎にかけ、クロロプラストを抽出するような形にして *E. dispar* の培地に添加した。その結果は図 1 に示すが、使用した 5 株の *E. dispar* の全てに対して極めて良好な増殖促進効果を呈した。すなわち当初培地には $10^3/\text{ml}$ の *E. dispar* を加えて培養を開始したが、ツユクサの extract の遠心上清を 0.2ml ずつ各培地(6ml)に添加すると、培養開始後 72 時間で $10^5/\text{ml}$ 程度にまでアメーバが増殖することが確認された。昨年度の研究では gluconic acid、dihydroxyacetone を添加して作成した



* Leaves of Spider wort (*Commelina communis* L.)

図 1 ツユクサからの Extract を添加した YIGADHA-S medium における *E. dispar* の増殖

YIGADHA-S mediumでは、約5,000/mlのアメーバを添加した時、培養開始後72時間で約3倍程度に増殖するのみであった。単純に比較は出来ないが、増殖倍率のみからみれば今回の培養液では前回の30倍程度の増殖を示した事となる。現在培養は上記のように6ml/tubeで行なっており、培養開始後72時間でculture tubeを遠心すると確実にpelletが形成される事も判明しており、今後の三角フラスコなどをを使用した大量培養に十二分に道を開くものと思われる。

上記の実験からクロロプラストを抽出する形にすると*E. dispar*の培養液内での増殖に極めて良好な影響を与えることが判明したので、クロロプラストにおける酸化・還元機構に重要な役割を果たしているフェレドキシンに注目して、その増殖促進効果について検討した。その結果、2.5 μ g/mlのハウレンソウのフェレドキシンが図1に示したのに近い増殖促進効果と同じ5株の*E. dispar*に対して示すことが判明した。この培養液の組成を表1に示した。また興味あることに、同じ iron-sulfur proteinであるチオレドキシンは効果がなく、フェレドキシンに特異的な作用である可能性を推測させた。他のフェレドキシンを調べることは出来なかったが、今後の検討課題となろう。また我々の研究室ではYI-S mediumの滅菌方法をかえて作成

したFYI-S medium (YI-S mediumをフィルターで濾過して滅菌した培養液)ではそれまでアメーバの培養に必須と思われていたL-cysteineを添加しなくともアメーバが増殖することを確認しており、アメーバの増殖と-SHおよび鉄の関係の解明は新しい段階を迎えつつあるものと思われる。

今回の培養液で得られた*E. dispar*株のうちAS2IRとCYNO09:TPCを使用して昨年同様4週令のオスハムスターの肝に直接500,000個の栄養型虫体を注射して肝膿瘍の形成の有無をみた。継時的に4週間外科的に観察した結果、肝膿瘍の形成は認められなかった。しかし我々は以前すでに代謝活性を失った*C. fasciculata*と共に培養した*E. dispar*をハムスター肝に注射した場合、肝膿瘍の形成は認められなくても、注射した局所に多核白血球の浸潤が起ることを見だしており、何らかの宿主側の反応を惹起できる事は有り得ると思われる。今回の実験では組織学的な検討までは行なっていないため、比較検討は出来ないが、今後検討を加えてゆきたいと考えている。

ここ3年間の実験で*E. dispar*の確実な無菌培養法を確立する事ができた。これにより*E. histolytica*と*E. dispar*が別種であることは完全に確定したものと云える。これにより以前から問題となっていたいわゆる isoenzyme conversionと云う現象も今更

表1 フェレドキシンを添加したYIGADHA-S mediumの組成

YIGADHA-S MEDIUM

Yeast Extract (BBL, 4311928)	-----30.0 g
Gluconic acid sodium salt	----- 5.0 g
Dihydroxyacetone(dimer)	-----1.0 g
NaCl	-----2.0 g
K₂HPO₄	-----1.0 g
KH₂PO₄	-----0.6 g
L-Cysteine-HCl (SIGMA, C-7880)	----- 1.0 g
Ascorbic acid	-----0.2 g
Ferric Ammonium Citrate	-----22.8 mg
Distilled water	-----880.0 ml
Adjust pH to 6.5 with NaOH. Filter-sterilize	

Bovine serum (heat-inactivated)	-----150.0 ml
Vitamin Mixture #18	----- 20.0 ml
Ferredoxin (2.5μg/ml)	

ではあるが、完全に否定されたものとする。今回の成果は今後エイズにおける *E. dispar* 感染の病態上の意義を明らかにする事につながるものと云えよう。今後まず種々の免疫不全状態にあるマウスなどに感染実験を試みる予定である。また今回の培養システムは *E. dispar* の細胞生物学的、生化学的な研究に大きな寄与をするものと思われる。これまで行なわれた遺伝子レベルの種々のデータを蛋白質などでのレベルで検討する事に初めて道が開かれたと云う事ができよう。

参 考

- 1) Weekly Epidemiology Record: Amoebiasis, 72, 97-100, 1997.
- 2) Reed, S. L., Wessel, D. W. and Davis, C. E.: *Entamoeba histolytica* infection in AIDS. Am. J. Med., 90, 269-271, 1991.
- 3) Clark, C. G.: Axenic cultivation of *Entamoeba dispar*, Brumpt, 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman, 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi, 1889. J. Eukaryot. Microbiol., 42, 590-593, 1995.
- 4) 竹内 勤、小林正規、今井栄子: *Entamoeba dispar* の無菌培養法の確立. HIV感染症に関する臨床研究. 平成10年度報告書. 38-42, 1999.



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¹⁾、竹内 勤²⁾

¹⁾国立感染症研究所 寄生動物部外来寄生動物室

²⁾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。一昨年・昨年度は本経路の二つの主要酵素、システイン合成酵素及びセリンアセチル転移酵素のクローニング及び生化学的解析を中心として行った。本年度は、これら主要酵素並びに本経路のインビボでの機能を明らかにするために、両酵素を過剰に発現する形質転換株を作成し、細胞の発現型の変化を調べた。その結果、システイン合成酵素の過剰発現株において細胞内チオール量が増加するとともに、過酸化水素への抵抗性が増した。このことは、赤痢アメーバにおいてシステイン生合成経路が抗酸素機構の重要な部分を担うことを直接的に示している。

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 Nozaki¹⁾ and Tsutomu Takeuchi²⁾

¹⁾ Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases and ²⁾ Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University, School of Medicine

目的

赤痢アメーバ症はエイズに合併する原虫性日和見感染症である。現在、メトロニダゾールを始めとした5-ニトロイミダゾール化合物が赤痢アメーバ症の第一選択剤であるが、これらの薬剤は催奇形性などの副作用がある。そこで我々は、副作用の少ない抗赤痢アメーバ剤を開発するためのターゲットを探すべく、赤痢アメーバ特異的な代謝経路を生化学的及び分子遺伝学的手法を用いて解析してきた。その中で、我々は赤痢アメーバ特異的なシステイン生合成経路を発見し、一昨年度より主要酵素のクローニングと生化学的解析を行ってきた(文献1、2、及び昨年度報告書)。セリンアセチル転移酵素(SAT)はacetyl-Coenzyme Aからserineへアセチル基を転移しO-acetylserine(OAS)を合成する酵素で、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調節酵素である。システイン合成酵素(CS)はOASとH₂Sからcysteineとacetateを合成する。本年度は、システイン合成経路のインビボでの働きを調べるため主要酵素であるSAT及びCSを過剰発現させた変異株を作成し、その発現型の変化を調べた。

方法

1. CS, SAT大量発現用プラスミドの作成

赤痢アメーバ細胞内でCS及びSATを大量発現させるためのプラスミドを作製した。概略を表1に示した。詳細は文献3に示した。形質転換株の選択にはネオマイシン耐性遺伝子を用い、上流・下流にアクチン遺伝子のflanking領域を置いた。CS, SAT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で増幅し、CSのflanking領域を転写プロモーター及びRNAプロセッシングシグナル領域として用いた。CS, SAT及びコントロールのルシフェラーゼを大量発現するプラスミドはpNEOCS, pNEOSAT, pNEOLUCと呼ぶ。

2. 赤痢アメーバの形質転換

赤痢アメーバ株 HM1: IMSS cl 6 の栄養型をリボソーム (Lipofectamine) を用い形質転換した。概略すると、10⁵ の栄養型を6穴プレートの35mmの各ウェルで12mlのTYI-S-33培地で35℃一晩培養した後、OptiMEM緩衝液で細胞を洗浄する。その後、栄養型を3µg プラスミドと15µl Lipofectamineによって作った複合体とともに35℃3時間培養し、24時

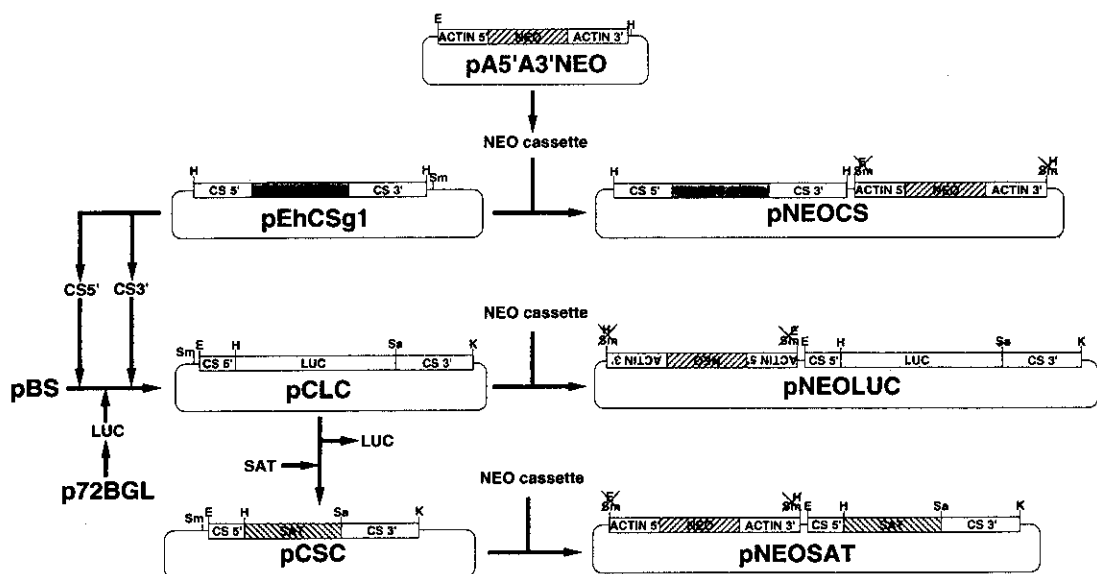


図1 CS, SAT, ルシフェラーゼを大量発現する形質転換株作製のためのプラスミドのフィジカルマップ

蛋白コード領域は斜線又は色付きボックスで示した。プラスミド領域は線で示した。ACTIN; *E. histolytica* アクチン遺伝子; NEO, ネオマイシン耐性遺伝子蛋白コード領域; LUC, ルシフェラーゼ蛋白コード領域; CS, *EhCS1* 蛋白コード領域; SAT, *EhSAT* 蛋白コード領域; NEO cassette, ネオマイシン耐性遺伝子蛋白コード領域及びアクチン遺伝子上流・下流域を含んだ断片; 5' 及び 3', 5'-及び3'-非翻訳領域; E, *EcoR* I; H, *Hind* III; Sm, *Sma* I; Sa, *Sal* I; K, *Kpn* I.

間通常の TYI-S-33 培地で培養した後、6 μ g/ml のジェネティシンを加え、形質転換株を選択する。

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100 μ l 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 cysteine 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 Na₂S, 5 mM dithiothreitol, 0.01 unit の組み換えシステイン合成酵素(文献1)を含む 100 μ l の溶液で行った。システイン合成酵素の活性測定は50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 12.5 mM O-acetylserine, 25 mM Na₂S 30°C で10-120分行った。生じたcysteine量はGaitondemらの方法により測定した。1 unitの活性は25°C 1分間に1 μ moleのacetyl-CoA のチオエステル結合を切断する活性或いは、1 μ moleのL-cysteineを生成する酵素量と定義した。

4. 細胞内チオール量の測定

栄養型粗抽出液を perchloric acid による脱蛋白の前に6mMで1時間、電気的に還元した。チオール

量は5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)を還元して得られた5-mercapto-2-nitrobenzoateのA412(lower case)を計測して求めた。

5. 過酸化水素への感受性試験

短時間での過酸化水素に対する感受性を比較するため、冷却した磷酸緩衝液(PBS)で洗浄した栄養型を1% glucose を含んだPBSに 2.5×10^4 /mlで懸濁した。100 μ lの細胞懸濁液を様々な過酸化水素を含んだ等量の溶液と混ぜ、25°Cでインキュベートし、適時一部を取り、等量の0.4% Trypan Blueと混和して生細胞の割合を算出した。また、長期間の過酸化水素に対する感受性を比較するために、通常のTYI-S-33培地中で様々な濃度の過酸化水素の存在下で栄養型を培養した。

結果

1. SAT, CS大量発現株の酵素活性の測定

図2に示すとおり、pNEOCSで形質転換した株はpNEOLUCで形質転換した株の約2.7倍のCS活性及び2.1倍のSAT活性を示した。また、pNEOSATで形質転換した株は同等のCS活性及び13.3倍のSAT活性を示した。CS活性はwildtypeでも高く過剰発現には限界があったのに対し、SATは10倍以上過剰に発現が可能であった。CS過剰発現株にお

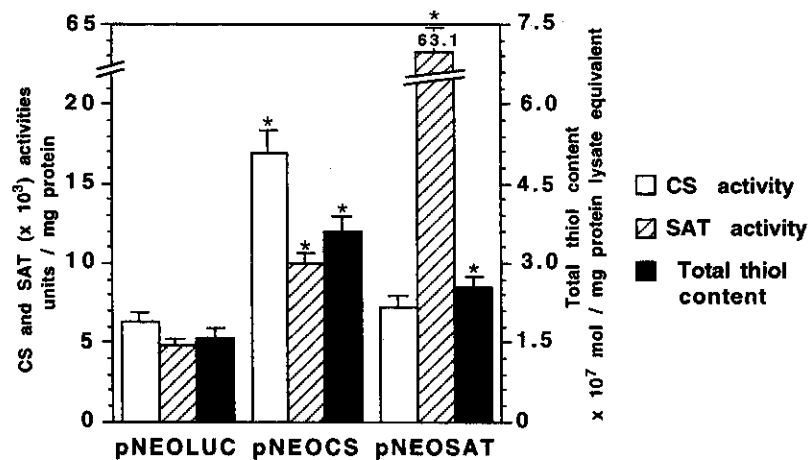


図2 pNEOLUC, pNEOCS 及び pNEOSAT で形質転換して得られた変異株の CS 及び SAT 活性と総チオール量
CS 並びに SAT 活性、総チオール量は粗抽出液の蛋白量で標準化した。白棒、斜線棒、黒棒はそれぞれ CS 活性、SAT 活性、総チオール量を表す。Student t test、 $p < 0.05$ で有意と考えられた差異をアスタリスクで示した。

ける SAT 活性の上昇の理由は不明である。

2. SAT, CS大量発現株の総チオール量の測定

図2に示すとおり、pNEOCSで形質転換した株はpNEOLUCで形質転換した株の約2.5倍のチオール量を示した。また、pNEOSATで形質転換した株は1.7倍のチオール量を示した。この結果はSAT活性ではなくCS活性が総チオール量に強く相関することを示している。

3. SAT, CS大量発現株の過酸化水素感受性試験

図3に短時間での各形質転換株の過酸化水素に対する感受性の違いを示した。1M 過酸化水素に対しては感受性の違いは検出できなかったが、10mM及び100mM過酸化水素に対してはpNEOCS形質転換株が有意に他の形質転換株よりも耐性を示した。たとえば10分或いは20分後にCS大量発現株ではコントロールの1.8倍或いは3.1倍生細胞の割合が高かった。また、通常の培地を用いた培養実験では、8mM以上の過酸化水素の存在下ではどの形質転換株も生育できなかつた。しかし、4mM 過酸化水素存在下ではコントロール及びSAT大量発現株が生育できなかつたのに対し、CS大量発現株は過酸化水素が添加されなかつた場合と同じ増殖速度を示した。

考 察

赤痢アメーバはカタラーゼ、グルタチオン、グルタチオン酸化還元系をもたない。その代わりに、高濃度のL-cysteineをもつ。L-cysteineは赤痢アメーバにおける最高濃度のチオール化合物である。その生理的重要性は細胞増殖、接着、運動などに関して示されている。我々はシステイン合成経路における3つの主要酵素をクローニングし、解析してきた(文献1-4)。ひとつは一昨年度の報告書でも詳述した最終段階を触媒するシステイン合成酵素であり、二つ目は硫黄同化の初段を担うATPスルフィラーゼである。更に昨年度はシステイン生合成の調節酵素であるセリンアセチル転移酵素を同定し、酵素学的検討を行った。しかしながら、システイン生合成経路のインビボでの役割は明らかになっていなかった。そこで我々は主要2酵素を大量に発現する形質転換株を作製し、その発現型、特に、細胞内チオール量及び過酸化水素に対する感受性の変化を検討し、本経路の生理的意義を明らかにした。

赤痢アメーバは組織侵入の際、スーパーオキシド・ヒドロキシラジカル・過酸化水素などの様々な酸素ストレスに曝されるが、殺アメーバ作用は専ら過酸化水素によることが示されている。従ってシステイン合成経路を中心とした抗過酸化

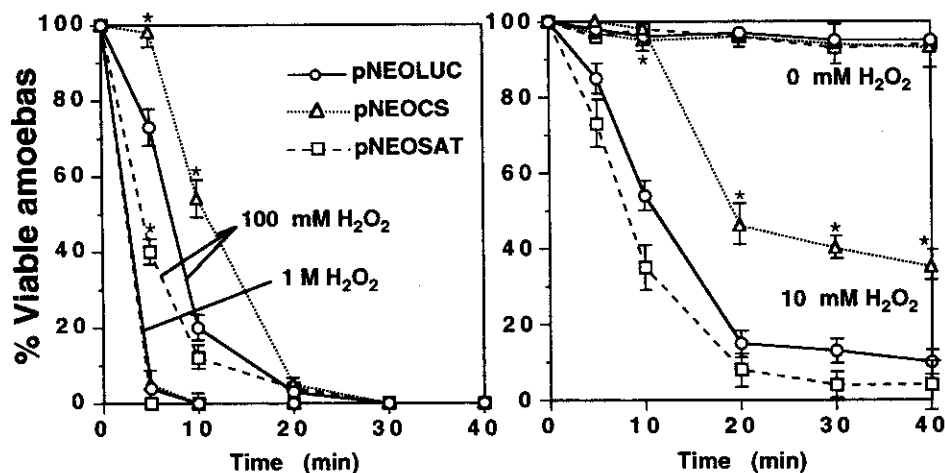


図3 ルシフェラーゼ、CS及びSAT大量発現株の過酸化水素に対する感受性

2.5×10^3 個の栄養型の懸濁液を 10, 100 又は 1000 mM の過酸化水素と 25°C でインキュベートした。丸及び実線、pNEOLUC 形質転換株；三角及び点線、pNEOCS 形質転換株；四角及び破線、pNEOSAT 形質転換株。Student t test、 $p < 0.05$ で有意と考えられた差異をアスタリスクで示した。

水素機構が、アメーバの宿主の中での生存に不可欠であることが示唆される。更に、本経路はヒトをはじめとした哺乳類には存在せず、赤痢アメーバ症の診断・治療法開発のための有望な標的と考えられる。

結 論

我々はHIVの日和見感染症の原因原虫として大切な赤痢アメーバにおける特異的システイン生合成経路を詳細に検討してきた。その結果、本経路が抗過酸化水素機構に関与することをインビトロ、インビボで示した。更に、本経路は有望な抗アメーバ剤開発の標的であることが明らかとなった。今後、主要2酵素の阻害剤の検索を中心に抗赤痢アメーバ剤の開発のターゲットとしての可能性を追求したい。

参考文献

- 1) Nozaki, T., Asai, T., Kobayashi, S., Ikegami, F., Noji, M., Saito, K., and Takeuchi, T. Molecular cloning and characterization of the genes encoding two isoforms of cysteine synthase in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 1998 97: 33-44.
- 2) Nozaki, T., Arase, T., Shigeta, Y., Asai, T., Leusteck, T., and Tsutomu, T. Cloning and bacterial expression of adenosine-5'-triphosphate sulfurylase from an enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Biochim Biophys Acta* 1998 1429: 284-291.
- 3) Nozaki, T., Asai, T., Sanchez, L. B., Kobayashi, S., Nakazawa, M., and Takeuchi, T. Characterization of the gene encoding serine acetyltransferase, a regulated enzyme of cysteine biosynthesis from the protist parasites *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Regulation and possible function of the cysteine biosynthetic pathway in *Entamoeba*. *J Biol Chem* 1999 274: 32445-32452.
- 4) Nozaki, T., Tokoro, M., Imada, M., Saito, Y., Abe, Y., Shigeta, Y., and Takeuchi, T. Cloning and biochemical characterization of genes encoding two isozymes of cysteine synthase from *Entamoeba dispar*. *Mol Biochem Parasitol* 2000 (In press).



新種の寄生原虫 *Neospora caninum* の NTPase について (ヒト日和見感染症検索 のための基礎研究)

浅井 隆志¹⁾、三浦 恵²⁾、竹内 勤¹⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部 熱帯医学・寄生虫学教室

²⁾横浜市立大学医学部 ラジオアイソトープ研究センター

研究要旨

最近新種として登録された *Neospora caninum* は、エイズ患者に多発するトキソプラズマ症の原因原虫である *Toxoplasma gondii* と形態学的・系統発生的に非常に近い。*N. caninum* もヒトに感染することが考えられるが、現在人体寄生例は世界中で一例も報告されていない。しかし、免疫不全患者のトキソプラズマ症の中には *N. caninum* 感染が含まれる可能性があり、その検索が必要とされている。

我々は *T. gondii* 虫体に特異的にしかも大量に存在する酵素(ジチオスレイトールにより活性化されるヌクレオシド三リン酸加水分解酵素;NTPase)に類似した *N. caninum* 虫体に存在する酵素(NcNTPase)を見出し、その遺伝子のヌクレオチド配列を明らかにした。このNcNTPaseの予想されるアミノ酸配列は *T. gondii* のNTPaseのそれと約69%の相同性があり、*T. gondii* にふたつあるアイソザイム(NTPase-I及びNTPase-II)のうちNTPase-Iに近いことがわかった。反応速度論的解析を行ったところ、遺伝子のヌクレオチド配列の結果と同様にNcNTPaseの基質との反応性は *T. gondii* のNTPase-Iと似ていた。また *N. caninum* 虫体からは *T. gondii* のNTPase-IIに似た酵素活性は確認されなかった。その後NcNTPaseにもアイソザイムの存在が確認されたが両アイソザイムのアミノ酸配列の違いはわずか4箇所であり、それも予想される基質の結合部分とは異なる部位であった。その他、*T. gondii* のNTPaseは虫体のdense granuleに存在し、宿主細胞に感染後虫体外に放出されるが、NcNTPaseも同様であると考えられた。

N. caninum の人体寄生例検索のために、このNcNTPase遺伝子組換え体を作製し、ヒトIgG抗体との反応性を酵素抗体法(ELISA)で調べた。健康人30名のIgG抗体とNcNTPaseは反応せずELISA吸光度は低値(平均値0.04)であった。色素試験陽性者(*T. gondii*感染者)73名のうち2名のIgG抗体だけがNcNTPaseに反応し陽性であった(m+3SD以上)が、のこり71名のIgG抗体は全く反応しなかった。このことから、NcNTPaseは *N. caninum* の人体寄生例の検索に有用な抗原であることが示唆された。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：浅井隆志、三浦 恵

Characterization of NTPase from newly recognized parasitic protozoan *Neospora caninum* (basic research for human opportunistic infection)

Takashi Asai¹⁾, Satoshi Miura²⁾ and Tsutomu Takeuchi¹⁾

¹⁾ Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine Keio University, ²⁾ Radioisotope Research Center, School of Medicine, Yokohama City University

目的

最近新種として登録された *Neospora caninum* は1988年に米国農務省のJ.P.Dubeyら¹⁾によって最初に犬より分離された細胞内寄生原虫で、トキソプラズマ症の原因原虫である *Toxoplasma gondii* と形態学的・系統発生学的に非常に近い^{2,3,4)}。*T. gondii* はヒトを含むすべての哺乳類および鳥類に感染し、一度感染すると宿主の一生を通じて慢性的に感染していると考えられている⁵⁾。世界人口の約50%の人々が感染していると推定される。たとえば、東京の感染率は約20%、フランスの首都パリの感染率は70%以上である⁶⁾。このことから *N. caninum* もヒトに感染することが考えられるが、現在人体寄生例は世界中で一例も報告されていない。したがって、*N. caninum* の人体寄生例の検索が必要とされている。*T. gondii* の急増虫体にはジチオスレイトールにより活性化されるヌクレオシド三リン酸加水分解酵素(NTPase)が大量に存在する^{7,8)}。さらにこのNTPaseには二つのアイソザイム(NTPase-I及びNTPase-II)が知られている⁹⁾。NTPase-Iはヌクレオシド三リン酸を優先的に加水分解し、ヌクレオシド二リン酸はほとんど加水分解しない。一方NTPase-IIは両ヌクレオチドを同じように加水分解する。NTPase-IIは *T. gondii* のすべての株に共通して存在するが、NTPase-Iは強毒株にのみ存在する。ジチオスレイトールにより活性化されるNTPaseは *T. gondii* にのみ存在すると考えられていた。*N. caninum* は *T. gondii* と非常に近縁の原虫であることから *N. caninum* にもジチオスレイトールにより活性化されるNTPaseが存在するのではないかと考え検索を開始したところ、*N. caninum* 虫体の細胞質分画から強力なNTPase活性が検出された。

本研究の目的は *N. caninum* のNTPase(NcNTPase)の諸性質及び遺伝子のヌクレオチド配列を明らかにし、*T. gondii* のNTPaseとの違いを調べ、これらの結果を利用して *N. caninum* のヒト、特にエイズなど免疫不全患者への感染の有無を検索することである。

方法

1. 原虫の培養

五株(Nc-1, Nc-2, Nc-LIV, BPA-1, BPA-3)の *N. caninum* 及び *T. gondii* のRH株の急増虫体をヒト線維芽細胞(HHF)を宿主として *in vitro* 培養した。培地にはダルベッコのMEMに10%FBS、2mMグルタミン、20 μ g/ml ゲンタミシンを加えた。増殖したtachyzoiteは3 μ m径のフィルター(Nucleopore)で分離する記載の方法¹⁰⁾で集め、使用時まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

2. ウエスタンブロットによる交叉反応の確認

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動¹¹⁾で *T. gondii* のRH株及び *N. caninum* のNc-1株の急増虫体全蛋白質を分離後、ニトロセルロース膜に転写した。この膜をスキムミルクでブロッキングして非特異結合反応を阻止した後、抗 *T. gondii* NTPaseの兎ポリクローナルIgG抗体¹²⁾を反応させ、^[125-I]Protein Aで抗体の反応位置を標識、Kodak XARフィルムで検出した。

3. 酵素活性の測定

凍結保存してある急増虫体($\sim 3 \times 10^7$)を0.5mlの20mM Hepes-KOH, pH7.5/0.9% NaCl液に懸濁後、20kHzで10秒間超音波処理し、10000rpmで10分間遠心した。上清に20%になるようにグリセリンを加え、これを酵素液とした。NTPaseの部分精製、酵素反応液の組成、活性の測定は記載の方法⁹⁾で行った。分解されたヌクレオチドはHPLCで記載の方法¹³⁾で行った。

4. 遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

N. caninum の急増虫体のmRNAを抽出し、これを用いてUni-ZAPラムダcDNAライブラリーを製作した。抗 *T. gondii* NTPase兎IgG抗体を用いてライブラリーをスクリーニングし、NcNTPaseのcDNAクローンを得た。得られたクローンの塩基配列を調べたところ全長でなかったため、5'側をPCR法で合成し全長を得た。

5. サザンブロットによる遺伝子コピー数の検出

N. caninum の Nc-1 株の染色体 DNA(2.5 μ g)を制限酵素(SacII or SmaI: ORF上に一カ所切断部位がある酵素; ApaI, EcoRV, XhoI: ORF上に切断部位のない酵素)で処理した後、1%のアガロースゲルで電気泳動した。このゲルからナイロン膜にDNAを転写後、染色体DNAを鋳型にして合成したDNAをランダムプライミング法により $[^{32}\text{P}]$ でラベルしたプローブとし、これをナイロン膜とハイブリダイズさせた。これを洗浄後、Kodak XARフィルムでプローブの結合位置を検出した。

6. 免疫電顕法によるNcNTPaseの存在部位の検索

*N. caninum*の急増虫体を2.5%フォルマリン及びグルタルアルデヒドで1時間固定した後、10%ゼラチンに包埋した。これを蔗糖/PVPに浸透した後、液体窒素で凍結した。次にクリオスタットで凍結切片を作製し、抗*T. gondii* NTPase 兎IgG抗体を反応させた。これに18-nmのコロイダルゴールドの結合した抗兎IgGヤギIgGを反応後、酢酸ウラニルで対比染色し、電子顕微鏡で観察した。

7. 遺伝子組換え体抗原の作製と血清反応

血清は慶應義塾大学病院と東京慈恵会医科大学病院で最近5年間に集められたトキソプラズマ陽性血清を無作為に選出した(色素試験陽性73検体)。陰性対照群には健常人で色素試験陰性者の血清(30検体)を用いた。

N. caninum の NcNTPase の遺伝子はプライマー(forward oligo 5'-TACCATATGGCCGACGAGCCAGCGACTT-3'; reverse oligo 5'-TCGCTCGAGTCACATGTTGTAGGTA ATCC-3')を用いてPCR法により*N. caninum* Nc-1株のgenomic DNAを鋳型にして増幅した。最初の変性を94 $^{\circ}$ C 5分とし、変性に94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリングに65 $^{\circ}$ C 1分、伸長反応に72 $^{\circ}$ C 2分のサイクルを40回行い、最後の伸長反応を72 $^{\circ}$ C 5分とした。

PCR産物を1.2%アガロースゲルで電気泳動し、該当するバンドを切り出して発現ベクターであるpET22(b)⁺(Novagen, USA)のNdeI/XhoIサイトに組み込んだ。これをElectro cell manipulator (BTX,

USA)を用いて大腸菌BL21に導入した。NcNTPaseの発現は、37 $^{\circ}$ Cで50 μ g/mlのアmpiシリンを加えたLB brothで2~2.5時間培養後、0.2 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)を加え、さらに37 $^{\circ}$ Cで2~2.5時間培養して行った。得られた遺伝子組換え体抗原の封入体を6Mのグアニジン塩酸で溶解した後、50 mM トリス塩酸, pH 7.5で6倍にうすめ一晩4 $^{\circ}$ Cで放置した。これを過剰量(3000倍)の50 mM トリス塩酸, pH 7.5に対して一晩4 $^{\circ}$ Cで透析することで活性を還元した。これをイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法⁹⁾により精製した。

精製した抗原を用いてELISAを行い、各検体(ヒト血清)の示す吸光を測定した。ELISAは記載の方法¹⁴⁾で行った。

色素試験(Dye-Test)は生きたトキソプラズマRH株の急増虫体をアルカリメチレンブルーで染色する方法¹⁵⁾で行った。

結 果

1. NcNTPaseの存在の確認と細胞内に於ける存在部位

五株の*N. caninum*と*T. gondii*のRH株のNTPase活性をまとめた結果が表1である。Nc-1, BPA-1, BPA-3株のNTPase活性は*T. gondii*(RH株)の約半分であるが、Nc-2, Nc-LIV株はRH株と同等のNTPase活性が検出された。このことからどの*N. caninum*株にもNTPase活性の存在が確認された。

抗*T. gondii* NTPase抗体を用いてウエスタンブロットを行い長時間フィルムの感光を行うと、*T. gondii*の全蛋白質を抗原とした場合、シグナルの殆ど(95%以上)は67Kに出現するが、67Kの上下に多少シグナルが現れた(図1)。この条件下で*N. caninum*の全蛋白質を抗原としたレーンを見ると、67Kにただ一本のバンドとしてシグナルが見られた(図1)。このことは*T. gondii*のNTPaseに対する抗体と反応する抗原が*N. caninum*に存在することを示している。またこの抗原は*T. gondii*のNTPaseとほぼ同一の分子量であることがわかった。以上の結果から、*N. caninum*にも*T. gondii*のNTPaseと類似した酵素(NcNTPase)が存在することがわかった。

NcNTPaseの存在が確認されたので、免疫電顕法で細胞内におけるNcNTPaseの存在部位を確認した。コロイダルゴールドは虫体のdense granule上に存在する(図2)ことから、*T. gondii*のNTPaseと同様にNcNTPaseは合成された後dense granuleに移送され、宿主細胞に感染したときparasitophorous vacuole内に放出されるものと考えられた。

2. 遺伝子のコピー数と塩基配列

cDNAライブラリーより*T. gondii*のNTPaseに対する抗体でスクリーニングすることでNcNTPaseの遺伝子をクローニングした。そして全塩基配列

を決定した。塩基配列の情報をもとにサザンブロットによるNcNTPase遺伝子のコピー数を推定した。ORF上に切断部位がある制限酵素と切断部位の無い制限酵素を反応させてみたところ、どちらの酵素でも複数のバンドが見られた(図3)。特にORF上に切断部位のないEcoRVでは三つのバンドが確認され、少なくとも三コピーの遺伝子が存在することが推定された(図3)。今回の研究ではこのうちの二つの遺伝子の塩基配列を決定した。これらの塩基配列から予想されるNcNTPaseのアミノ酸配列を*T. gondii* RH株のNTPaseのそれと比較したものが図4である。NcNTPaseは626個のアミ

表1 五株の*N. caninum*と*T. gondii* RH株のNTPase活性

株	NTPase活性 (μ mol/min/mg protein) *
Nc-1	15.9 \pm 5.3
Nc-2	29.7 \pm 20.8
Nc-LIV	21.0 \pm 14.5
BPA-1	16.1 \pm 5.4
BPA-3	13.9 \pm 10.2
RH(<i>T. gondii</i>)	31.0 \pm 7.2

*Mean \pm SD (N=3,4)

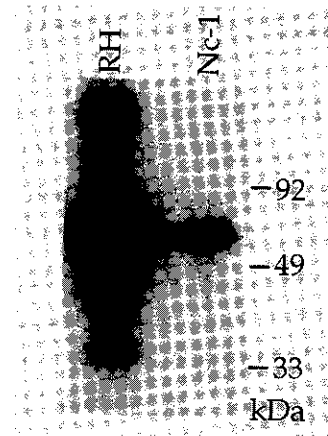


図1 抗*T. gondii* NTPase抗体が結合するNcNTPaseのウエスタンブロットによる解析

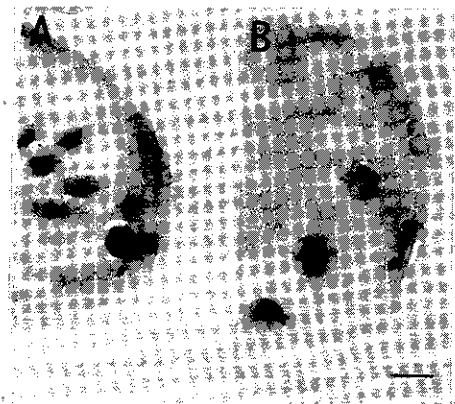


図2 免疫電顕によるNcNTPaseの*N. caninum*虫体における存在部位
A)対照;非免疫兔IgGを使用。B)抗*T. gondii* NTPase抗体使用

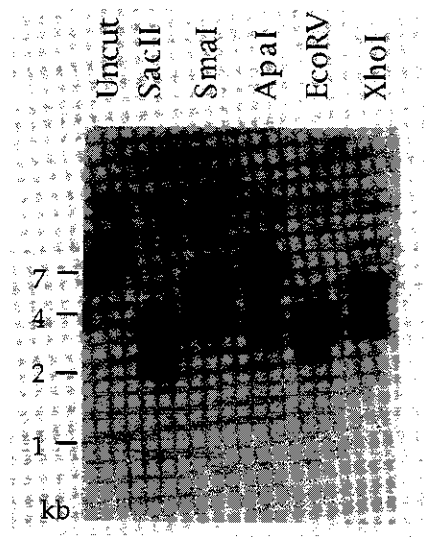


図3 サザンブロットによるNcNTPase遺伝子のコピー数の検索
SacII or SmaI: ORF上に一カ所切断部位がある酵素。ApaI, EcoRV, XhoI: ORF上に切断部位のない酵素

Tg/NTPase-I:	MWLPVYVPLLLVFGVSLSLPQSSLGTDSSSLRGVDADTEKRINVGKKHLQ	50
Tg/NTPase-II:	-----H-----T-----	
Nc/NTPaseIA:	-GV-IWAGC--L---I--L-DCADPAT---S-E--H-SA--AR--	
Nc/NTPaseIB:	-GV-IWAGC--L---I--L-DCADPAT---S-E--H-SA--AR--	
Tg/NTPase-I:	TLRNLETRCHDSIQALVVIDAGSSSTRNVFLAKTRSCPKNKGRSIDPDSI	100
Tg/NTPase-II:	-----	
Nc/NTPaseIA:	D--DA-R---AW--I---G--A--D-----RG--H-----	
Nc/NTPaseIB:	D--DA-R---AW--I---G--A--D-----RG--H-----	
Tg/NTPase-I:	***** QLIGAGKRFAGLRVVLEWLDTYAGKDWESRPVDARLLFQYVPMHEGAK	150
Tg/NTPase-II:	RE--T-----	
Nc/NTPaseIA:	R-I-GA--A--G--S--A--E---S-SKR--H--E-EDS-R	
Nc/NTPaseIB:	R-I-GA--A--G--S--A--E---S-SKR--H--E-EDS-R	
Tg/NTPase-I:	KLMQLLEEDTVAILDSQLNEKQKQVVKALGIPVMLCSTAGVRDFHEWYRD	200
Tg/NTPase-II:	-----	
Nc/NTPaseIA:	G-----D-A-R--EK-T-E---Q-M-V-L-----D--E	
Nc/NTPaseIB:	G-----D-A-R--EK-T-E---Q-M-V-L-----D--E	
Tg/NTPase-I:	ALFVLLRHLINNPSPAHGYKFFTNPFWTRPITGAEGLFAFITLNHLSRR	250
Tg/NTPase-II:	-----	
Nc/NTPaseIA:	---I-F--H-K-G---E-----Y-LA---G-	
Nc/NTPaseIB:	---I-F--H-K-G---E-----Y-LA---G-	
Tg/NTPase-I:	LGEDPARCMIDEYGVKRCRNDLAGVVEVGGASQIVFPLQEGTVLPSSVR	300
Tg/NTPase-II:	-----	
Nc/NTPaseIA:	-----YV--M-Q---V-----T-----D-A--I-	
Nc/NTPaseIB:	-----YV--M-Q---V-----T-----D-A--I-	
Tg/NTPase-I:	AVNLQQRERLLPERYPSADVVSVSFMQLGMASAGLFLKELCSNDFLQGG	350
Tg/NTPase-II:	-----	
Nc/NTPaseIA:	---H-F--S-F-C---I-----V--S--F---A--RHQ-	
Nc/NTPaseIB:	---H-F--S-F-E---I-----V--S--F---A--RHQ-	
Tg/NTPase-I:	ICSNPCLFRKFGQSCSAGEVEVRPDGSASVNEVDVRKRLKPLATYCSVNN	400
Tg/NTPase-II:	-----H-----	
Nc/NTPaseIA:	--Y--I-R--R-A---D--IL--TIV-D---K--V--S--AN-	
Nc/NTPaseIB:	--Y--I-R--R-A---D--IL--TIV-D---K--V--Y--AN-	
Tg/NTPase-I:	PEISFKVTNEMQCRENSIDPTKPLAERMKIENCSIIRGTGNFDKCVSQVE	450
Tg/NTPase-II:	-----E-----	
Nc/NTPaseIA:	---AM---K---S---LR-DD-FQ-V---D--T-QA--	
Nc/NTPaseIB:	---AM--T--V-K---S---LR-DD-FQ-V---D--T-QA--	
Tg/NTPase-I:	SILVAPKPLPANIEAASSGFESVDQVFRFASSTAPMIVTGSMLAINT	500
Tg/NTPase-II:	-----H--RE--S-D	
Nc/NTPaseIA:	EL--S-RF-----G--K--TAS-VI--GA-Y-S-S-	
Nc/NTPaseIB:	EL--S-RF-----G--K--TAS-VI--GA-Y-S-S-	
Tg/NTPase-I:	LKDHRLLRSDFSGDVEELAAEAAREFCSSSEVIIRTDGPVIQLPNARGEQKL	550
Tg/NTPase-II:	-----	
Nc/NTPaseIA:	MQGLG--PK--P--L-Q-IA-S-TY--P-VNSG--L-----	
Nc/NTPaseIB:	MQGLG--PK--P--L-Q-IA-S-TY--P-VNSG--L-----	
Tg/NTPase-I:	NSLNFDLCKTMALTVSLLRHMAAGENQPSFIKWEKSIAGPDGKPLADLGW	600
Tg/NTPase-II:	-----	
Nc/NTPaseIA:	T-M-Y---I---IQ--E--HK--S-S-Q--VV---R----	
Nc/NTPaseIB:	T-M-Y---I---IQ--E--HK--S-S-Q--VV---R----	
Tg/NTPase-I:	QVGVLHVVLFTEWGRNAYEAGYSHNL	628
Tg/NTPase-II:	-----T-----	
Nc/NTPaseIA:	H--A--R-----T---T-FTY-M	
Nc/NTPaseIB:	H--A--R-----T---T-FTY-M	

図4 *T. gondii* NTPase-I および NTPase-II と *N. caninum* の NTPase (NTPaseIA, NTPaseIB) のアミノ酸配列の比較。Dash は *T. gondii* の NTPase-I と同じアミノ酸を表す。点は配列の欠損を表す。四角で囲った所は *N. caninum* の NTPase のアミノ酸配列が *T. gondii* の NTPase-I あるいは NTPase-II のそれと同じであることを表す。星印は予想される ATP の結合部位を表す。

ノ酸残基よりなり、24個のシグナルペプチドと推定される配列がN-末端に存在した。*T. gondii*のNTPaseより2個のアミノ酸が足りないが、これは545と546番目のアミノ酸が欠落しているためであった。*T. gondii*のNTPaseとNcNTPaseは約69%のアミノ酸配列の相同性が見られた。予想される基質の結合部位のアミノ酸配列は*T. gondii*にあたるアイソザイムのうちtype-I(NTPase-I)に近かった。cDNAライブラリーの検索結果より、今回塩基配列を決定した二つの遺伝子は虫体中で発現されていることが確認された(Data省略)。したがって三つ目の遺伝子はpseudogeneと考えられた。この結果は*T. gondii*のNTPaseと同様であった。しかし遺伝子の塩基配列から推定される*N. caninum*の二つのNcNTPase(NcNTPase-IA, NcNTPase-IB)のアミノ酸配列はわずか4個しか異ならず、しかも基質の結合部位とは違う場所であった。

3. NcNTPaseの基質特異性、反応速度定数

部分精製したnativeなNcNTPase、遺伝子組換えNcNTPase及び*T. gondii*のNTPase-IとNTPase-IIの基質特異性を比較した結果が表2である。nativeなNcNTPaseにはNcNTPase-IAとNcNTPase-IBが混在している。一方遺伝子組換えNcNTPaseはNcNTPase-IBである。nativeなNcNTPaseと遺伝子組換えNcNTPaseの基質特異性はどちらも同じであることから、NcNTPase-IAとNcNTPase-IBの基質特異性は同一であることがわかった。またNcNTPaseは*T. gondii*のNTPase-Iと同様な基質特異性であることがわかった。この結果は反応速度定数の比較でも同様であった(表3)。

4. 血清反応

遺伝子組換え体のNcNTPaseの一次構造はNativeなものと同じであるが、酵素活性のない封入体として合成された。そのため、よりNativeな高次構

表2 NcNTPaseと*T. gondii*のNTPase (TgNTPase)の基質特異性の比較

Nucleotide	NcNTPase (%)		TgNTPase (%)	
	Recombinant	Native	NTPase-I	NTPase-II
ATP	100*	100	100	100
GTP	104	105	102	98
ITP	112	110	109	97
UTP	92	87	96	91
CTP	87	86	91	90
TTP	87	86	91	87
dATP	105	105	105	100
ADP	<0.1	<0.1	1.0	97
GDP	<0.1	<0.1	0.9	96
UDP	<0.1	<0.1	0.6	65
CDP	<0.1	<0.1	0.6	70

*ATPの加水分解活性を100%とした。

表3 NcNTPaseと*T. gondii*のNTPase (TgNTPase)のATP、ADP加水分解におけるKm値の比較

Substrate	NcNTPase		TgNTPase	
	Recombinant	Native	NTPase-I	NTPase-II
MgATP	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.02	0.50 ± 0.05
MgADP	ND ^b	ND	1.20 ± 0.20	0.50 ± 0.07

^aMean ± SE (N=6)。

^b活性が低すぎて測定不能。

造に近づけるために酵素活性を還元した。遺伝子組換え体の NcNTPase の比活性は、虫体より精製された native な NcNTPase の比活性とほぼ同一で、活性が完全に還元されていることが確認された。

精製された遺伝子組換え体抗原を用いて ELISA を施行し、健常人と色素試験陽性者の IgG 抗体の遺伝子組換え体抗原に対する反応性を調べた結果が図 5 である。トキソプラズマに対する抗体を保有しない健常人(30例)は遺伝子組換え体抗原とは反応せず、すべての検体の示す吸光度は低値(0.04)であった。そこでこれらの検体の示した吸光度の平均値に標準偏差値の3倍の値を加えた数値($m+3SD$; 0.091)以下を陰性、それ以上を陽性と判断した。この基準での疑陽性者と判断される健常人の検体はひとつもなかった。また遺伝子組換え体の NcNTPase にもほとんどの色素試験陽性血清が反応せず、全体の陽性率は3%(2/73)であった。

考 察

T. gondii に特異的に存在すると考えられていたジチオスレイトールにより活性化される NTPase が *N. caninum* にも存在することを確認して、その

遺伝子をクローニングした。*N. caninum* では二コピーの NcNTPase 遺伝子が発現されている。しかし、二つの遺伝子の違いはわずかに四塩基だけであり、翻訳された酵素の活性に違いは認められなかった。そしてこの二つの酵素とも *T. gondii* の NTPase-I により近い推定アミノ酸配列であった(図 3)。酵素学的検索においても NcNTPase は *T. gondii* の NTPase-I に近いことが証明された(表 2、3)。*T. gondii* にはどの株にも共通して NTPase-II が存在しており、NTPase-I は強毒株にのみ存在する⁹⁾。*N. caninum* はマウスに対して病原性が低い。このことは *T. gondii* の NTPase アイソザイムの弱毒・強毒株における存在パターン結果と矛盾するが、*N. caninum* には NTPase-II が存在しないために病原性が低い理由であるとも考えられる。

寄生原虫にはプリン体の新生合成経路が存在せず、核酸合成その他に使われるプリンヌクレオチドはサルベージ経路により供給される。

NTPase の生理的役割として、宿主のヌクレオチドの加水分解を行いサルベージ経路の初段を担う可能性が考えられたが、この経路の意義としてはヌクレオチド二リン酸を加水分解する NTPase-II

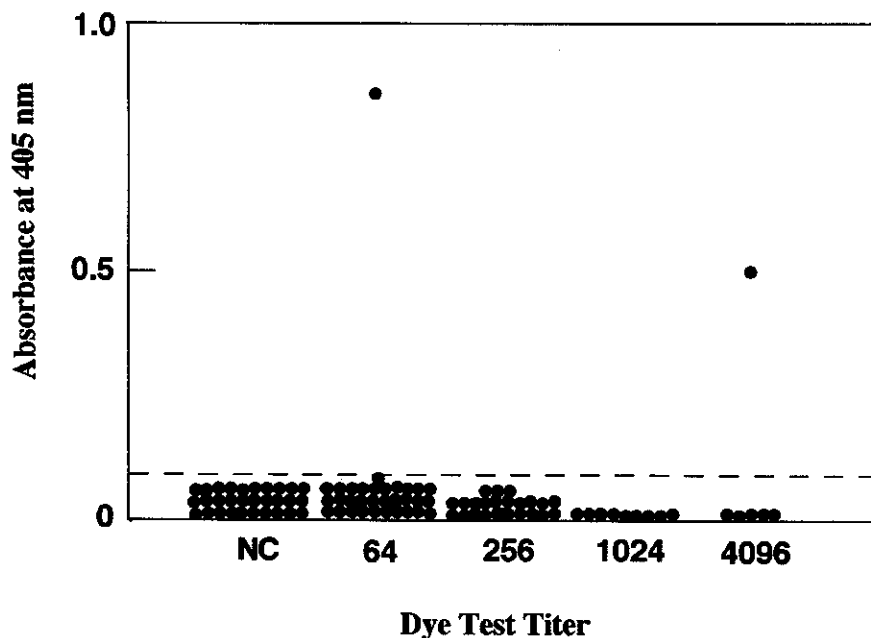


図 5 NcNTPase を抗原とした ELISA 吸光度と色素試験の抗体価を比較した Scatter plot。破線は色素試験抗体価陰性検体の ELISA 吸光度の平均値に標準偏差値の三倍の値を加えた時の吸光度($m+3SD$)。NC, 色素試験抗体価陰性検体。