

ブリダイズさせた。*E. moshkovskii*において、同等もしくはそれ以上の発現が認められた。赤痢アメーバと*E. moshkovskii*に対してそれぞれ作製したポリクローナル抗体の、これら2種のアメーバに対する抗体価を比較した結果、共通のエピトープと特異的なエピトープが存在することが示唆された。また、抗体で免疫染色してペルオキシレドキシンの細胞内局在を調べたところ、細胞質と核に強い反応が認められた。しかし、生虫体を抗体で処理しても染色されず、虫体表面にはペルオキシレドキシンの存在しないことが明らかになった。

2. 150-kDaおよび170-kDa表面レクチンによるワクチン効果の検討

グループ1と2の免疫血清は10倍希釈において、虫体の接着活性を免疫前血清処理の2%以下に抑制した。

アジュバントのみを接種されていた対照グループでは全例(9/9)で膿瘍が形成され、その容積は肝臓の約33%を占めていた。これに対して、グループ1では5/8、グループ2では3/9のハムスターのみに膿瘍が認められ、その平均容積もそれぞれ11%、8%であった。

D. 考察

*E. moshkovskii*のペルオキシレドキシンは、赤痢アメーバと比べてアミノ酸配列における相同性は高かったが、N末端の配列が欠失していた。赤痢アメーバのペルオキシレドキシンの配列に関して、N末端の配列が欠失すると酵素活性が半減するという報告があった。しかし、二種のアメーバの過酸化水素に対するペルオキシレドキシンの活性には有意な差は認められなかった。また、赤痢アメーバと*E. moshkovskii*の間で、ペルオキシレドキシンの局在や発現量にも差がなかった。従って、

*E. moshkovskii*の場合にも、ペルオキシレドキシンの遺伝子は、検出のための標的として適していると思われる。

組み換えタンパク質に対して作製したポリクローナル抗体の反応性から、*E. moshkovskii*と赤痢アメーバのペルオキシレドキシンの異なるエピトープが存在することが示唆され、*E. moshkovskii*に対しても特異的なモノクローナル抗体を作製することが可能であると考えられた。今後、このような抗体を作製することで*E. moshkovskii*の簡便な同定も可能になると思われる。

予防法開発に関する研究において、150-kDaおよび170-kDaの表面レクチンで免疫したハムスターでは肝膿瘍形成が有意に抑制されたことから、これらの表面タンパク質が赤痢アメーバ症のワクチン療法に応用できる可能性が示唆された。これらの表面タンパク質は赤痢アメーバに特異的であることから、血清診断用の抗原としても利用できる可能性が高い。従って、今後これらのタンパク質をコードする遺伝子をクローニングし、組換えタンパク質の調製を行う予定である。

E. 結論

赤痢アメーバと形態的に区別できない非病原性アメーバ(*E. moshkovskii*)について、ペルオキシレドキシンの性状を解析した結果、このタンパク質が検出同定のための標的に適していることが明らかになった。赤痢アメーバの150-kDaおよび170-kDa表面レクチンは、アメーバ症のワクチン候補として有望であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Kobayashi, S., Fujita, Y. and Udono, T. (2000) *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, detected in a colony of chimpanzees in Japan. *Parasitology Research*, 86: 537-541.

(2) Cheng, X.-J., Ihara, S., Takekoshi M. and Tachibana, H. (2000) *Entamoeba histolytica*: Bacterial expression of a human monoclonal antibody which inhibits *in vitro* adherence of trophozoites. *Experimental Parasitology*, 96: 52-56.

(3) Cheng, X.-J. and Tachibana, H. (2000) Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from *Entamoeba moshkovskii*. *Archives of Medical Research*, 31: S65-S66.

(4) Cheng, X.-J., Watanabe, K., Ihara, S., Takekoshi M. and Tachibana, H. (2000) Bacterial expression of a human monoclonal antibody that inhibits *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Archives of Medical Research*, 31: S311-S312.

(5) Kaneda, Y., Horiki, N., Cheng, X.-J., Tachibana, H. and Tsutsumi, Y. (2000) Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 25: 51-56.

(6) Tachibana, H., Cheng, X.-J., Kobayashi, S., Matsubayashi, N., Gotoh, S. and Matsubayashi, K. (2001) High prevalence of infection with *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, in captive macaques. *Parasitology Research*, 87: 14-17.

(7) Cheng, X.-J. and Tachibana, H.

(2001) Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by immunization with the 150- and 170-kDa surface antigens of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Research*, 87: 126-130.

2. 学会発表

(1) Tachibana, H., Cheng, X.-J. and Kaneda, Y. Cloning and characterization of peroxiredoxin genes from *Entamoeba dispar*. 第69回日本寄生虫学会大会. 2000年4月.

(2) Rivera, W. L., Cheng, X.-J., Takekoshi, M., Ihara, S., Kaneda, Y. and Tachibana, H. Expression of a recombinant Fab fragment of human monoclonal IgA specific for *Entamoeba histolytica*. 第69回日本寄生虫学会大会. 2000年4月.

(3) Kaneda, Y., Horiki, N., Tachibana, H. and Cheng, X.-J. *In vitro* chemotherapy of *Blastocystis hominis*. 第69回日本寄生虫学会大会. 2000年4月.

(4) 程 訓佳、金田良雅、橘 裕司. *Entamoeba moshkovskii*ペルオキシレドキシンの遺伝子クローニングと性状解析. 第41回日本熱帯医学会大会. 2000年10月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アメーバ症の化学療法剤の標的に関する研究

分担研究者 牧 岡 朝 夫 東京慈恵会医科大学助教授

研究要旨 新規化学療法剤の標的の研究として、赤痢アメーバ栄養型の増殖阻害因子を探索するとともに、アメーバ症に対する対策上非常に重要である嚢子に注目し、赤痢アメーバ嚢子形成のモデルとして重要な *Entamoeba invadens* の *in vitro* 嚢子形成系を用いてその形成機構の解明を行い、嚢子形成の阻害因子の探索も行った。その結果、抗腫瘍活性ならびに抗真菌活性を有することが明らかになっているアクチン重合促進安定化剤 Jasplakinolide (Jas) がアメーバ栄養型の増殖を阻害するばかりでなくその嚢子形成の阻害にも有効であることが確認され、これは Jas によるアクチン細胞骨格の攪乱によると考えられた。一方、シグナル伝達分子プロテインキナーゼ C (PKC) およびフォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI 3-K) は細胞の増殖分化をはじめとして多くの細胞機能を担うことが明らかになっている。そこで、アメーバの増殖および嚢子形成に対する PKC および PI 3-K 阻害剤の効果を調べた結果、両過程とも抑制され、増殖および嚢子形成に PKC ならびに PI 3-K の関与が明らかになり、これらが薬剤開発の重要な標的になることが示唆された。

A. 研究目的

アメーバ症に対する新規化学療法剤の標的の探索と開発を行う。アメーバ症対策において栄養型の殺滅とともに嚢子対策が重要な課題であり、これはまた嚢子キャリアーの問題とも関連している。嚢子形成機構に関してはまだ不明な部分が多く、この機構の解明は薬剤開発の新たな標的として重要である。そこで、栄養型の増殖阻害剤の探索とともに嚢子形成阻害剤ならびにその形成機構の解明を通じた薬剤開発の標的の探索を行う。

B. 研究方法

赤痢アメーバ HM-1 株栄養型の無菌培養は BI-S-33 培養液を用いて行った。薬剤による増殖阻害効果はこの培養系に薬剤を加え、3 日間培養後の虫体数を対照の虫体数と比較することにより増殖阻害効果として表した。赤痢アメーバの *in vitro* 嚢子形成系は確立されていないことから嚢子形成実験は *E. invadens* の *in vitro* 嚢子形成

系を用いた。即ち、BI-S-33 培養液中で増殖させた *E. invadens* IP-1 株栄養型を嚢子形成液 (47% LG) に移すことにより嚢子形成を誘導し、3 日間培養後嚢子と栄養型の虫体数を求め、嚢子形成率を算出した。栄養型と嚢子の形態的变化を観察するためコーン染色を施し、光学顕微鏡により観察し、電子顕微鏡による観察も行った。また、虫体アクチン蛋白の動態を調べるため、SDS ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびイムノブロットングを行った。Jasplakinolide は Molecular Probe から購入し、PKC 阻害剤として staurosporine、chelerythrine、calphostin C および *D-erythro*-sphingosine の 4 種 (Sigma) を用いた。前 2 者は PKC の catalytic domain に作用し、後 2 者は regulatory domain に作用することが明らかになっている。PI 3-K 阻害剤としては wortmannin (Sigma) を用いた。

c. 研究結果

1. アメーバの増殖および嚢子形成に対する

アクチン重合促進安定化剤Jas plakinolideの効果

アクチン重合促進安定化剤Jas plakinolide (Jas)は海綿の一種*Jaspis* sp. 由来のcytotoxinでアクチンの重合を促進し、形成されたF-アクチンを安定化する作用があり、同様な作用があるファロイジン(Phalloidin)と異なり、細胞膜透過性である。Jasは抗腫瘍活性ならびに抗真菌活性を有することが明らかになっている。そこで今回、このJasのアメーバの増殖、嚢子形成および細胞骨格に及ぼす効果につき検討した。

1)増殖に及ぼす効果：種々の濃度のJas存在下で3日間培養後の虫体数を比較した結果、濃度に依存した増殖抑制がみられ、1 μ Mの濃度で増殖を完全に抑制した。一方、*E. invadens*はJasに対してより抵抗性がみられた。2)細胞骨格への影響：Jas(0.5 μ M)存在下で培養後生残した赤痢アメーバ栄養型をコーン染色した結果、虫体内に平均直径10 μ mの円形構造が観察された。電子顕微鏡観察ではその構造内部は均一なgranular material で占められていた。FITC-ファロイジンで染色したところ、強く蛍光染色され、F-アクチンのaggregateであることが確認された。Jasで処理した*E. invadens*栄養型においても同様であった。3)細胞骨格中のF-アクチン量：Jasで処理した赤痢アメーバ栄養型から調製した細胞質分画と細胞骨格分画をSDS-PAGEおよびイムノブロットングにより調べた結果、対照に比し、F-アクチンaggregateの存在に対応して細胞骨格に含まれるF-アクチン量が増加していることが明らかになった。4)嚢子形成に対する効果：Jasは*E. invadens*の増殖および嚢子形成を抑制したが、嚢子形成を低濃度でより強く抑制した。5)効果の可逆性：Jasの効果の可逆性を検討した結果、嚢子形成に対しては非可逆的であった。6)嚢子細胞骨格への影響：Jasで処理した栄養型から形成された嚢子内にもアクチンaggregateが観察された。以上の結

果から、Jasはアメーバの増殖および嚢子形成を抑制し、虫体内にF-アクチンaggregateを形成させる効果があることが判明した。

2. アメーバの増殖および嚢子形成に対するシグナル伝達分子プロテインキナーゼC(PKC)阻害剤の効果：プロテインキナーゼC(PKC)は情報伝達系分子として種々の蛋白をリン酸化することにより細胞増殖、細胞分化を担うことが明らかになっている。そこで今回、アメーバの増殖および嚢子形成に対するPKC阻害剤の効果を調べた。1)増殖に及ぼす効果：種々の濃度の阻害剤存在下で7日間培養後の*E. invadens*栄養型の虫体数を比較した結果、staurosporineとchelerythrineが増殖を抑制したが、calphostin Cと sphingosineは抑制しなかった。このようにPKC阻害剤の作用部位の違いによる抑制効果の違いがみられた。2)嚢子形成に及ぼす効果：増殖の場合と同様、staurosporineとchelerythrineが嚢子形成を抑制した。また、chelerythrineによる嚢子形成の抑制は増殖抑制よりも強かった。staurosporineはPKC以外のキナーゼに対しても阻害作用があることから、以後chelerythrineを実験に用いた。3)効果の可逆性：chelerythrineの効果の可逆性を検討した結果、栄養型の増殖に対しては可逆的であったが、嚢子形成に対しては非可逆的であった。以上の結果から、アメーバの増殖ならびに嚢子形成にPKCが関与していることが明らかになった。

3. アメーバの増殖および嚢子形成に対するシグナル伝達分子フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-K)阻害剤の効果：フォスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-K)はその作用により産生された脂質産物が特定の蛋白に作用し多くの細胞機能を担うことが明らかになっている。そこで、アメーバの増殖および嚢子形成に対するPI3-Kの特異的阻害剤wortmanninの効果調べた。1)増殖に及ぼ

す効果：種々の濃度のwortmannin存在下で7日間培養後の*E. invadens* 栄養型の虫体数を比較した結果、濃度に依存した増殖抑制が認められた。2) 嚢子形成に及ぼす効果：増殖の場合と同様、wortmanninは嚢子形成を抑制した。また、その抑制の経過を調べたところ、wortmannin存在下では多数の栄養型が嚢子に変わることなく生残した。3) 効果の可逆性：wortmanninの効果の可逆性を検討した結果、栄養型の増殖に対しては可逆的であったが、嚢子形成に対しては非可逆的であった。以上の結果から、アメーバの増殖ならびに嚢子形成にPI 3-Kが関与していることが明らかになった。

D. 考察

アクチン重合促進安定化剤Jasplakinolide (Jas) はアメーバの増殖および嚢子形成の抑制に有効であることが明らかになった。Jasの標的はアメーバのアクチン細胞骨格であり、本来、アクチンは正常状態ではその重合・脱重合により機能を発揮するが、Jasによるアクチン重合の促進ならびにF-アクチンへの結合により脱重合が阻害されF-アクチンのaggregateが形成されると考えられる。正確な機構は不明であるが、その形成ならびに存在がアメーバの増殖および嚢子形成にとって不適になると考えられる。一方、PKC阻害剤およびPI3-K阻害剤によるアメーバの増殖、嚢子形成の阻害はPKCならびにPI 3-Kが両過程に関与していることを示し、特にこのin vitro嚢子形成におけるシグナル伝達に関しては全く不明であったが、本研究においてPKCおよびPI3-Kの関与が初めて明らかになった。

E. 結論

Jasはアメーバの増殖および嚢子形成を抑制し、虫体内にF-アクチンaggregateを形成させる効果があることが判明した。ア

メーバの増殖ならびに嚢子形成にPKCならびにPI3-Kの関与が明らかになり、これらが薬剤開発の重要な標的になることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: *Entamoeba invadens*: Protein kinase C inhibitors block the growth and encystation. *Exp. Parasitol.* 95, 288-290. 2000.
- 2) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Growth inhibition and actin aggregate formation of *Entamoeba histolytica* by jasplakinolide. *Arch. Med. Res.* 31, S145-S146. 2000.
- 3) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the encystation of *Entamoeba invadens*. *Arch. Med. Res.* 31, S185-S186. 2000.
- 4) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Effect of jasplakinolide on the growth, encystation, and actin cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *J. Parasitol.* 2001. in press
- 5) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Inhibition of encystation of *Entamoeba invadens* by wortmannin. *Parasitol. Res.* 2001. in press

2. 学会発表

- 1) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Effect of anti-microtubule drug oryzalin on the encystation of *Entamoeba invadens*. 第69回日本寄生虫学会大会. 2000年4月.

- 2) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Effects of cytochalasin D on the growth, encystation and multinucleation of *Entamoeba invadens*. 第69回日本寄生虫学会大会. 2000年4月.
- 3) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Growth inhibition and actin aggregate formation of *Entamoeba histolytica* by jasplakinolide. 12th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases. 2000年9月.
- 4) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the encystation of *Entamoeba invadens*. 12th Japanese-German Symposium on Protozoan Diseases. 2000年9月.
- 5) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤: 赤痢アメーバの増殖および細胞骨格に及ぼすアクチン重合促進・安定化剤Jasplakinolideの効果. 第60回日本寄生虫学会東日本大会. 2000年10月.
- 6) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤: チューブリン重合阻害剤オリザリンによる *Entamoeba invadens* のシスト形成の抑制. 第41回日本熱帯医学会大会. 2000年11月.
- 7) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤: *Entamoeba invadens* の増殖、シスト形成、多核化に及ぼすサイトカラシンDの効果. 第41回日本熱帯医学会大会. 2000年11月.
- 8) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤: チューブリン重合阻害剤オリザリンによる *Entamoeba invadens* のシスト形成の抑制. 第33回日本原生動物学会大会. 2000年11月.
- 9) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内 勤: *Entamoeba invadens* の増殖、シスト形成、多核化に及ぼすサイトカラシンDの効果. 第33回日本原生動物学会

大会. 2000年11月.

10) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Growth inhibition and actin aggregate formation of *Entamoeba histolytica* by jasplakinolide. XIV Seminar on Amebiasis. 2000年11月.

11) Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T.: Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the encystation of *Entamoeba invadens*. XIV Seminar on Amebiasis. 2000年11月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
 分担研究報告書

アメーバ症の新しい化学療法の確立および遺伝子診断法の作成についての研究

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所寄生動物部 室長

研究要旨 アメーバ症に対する新規薬剤を開発することを目的として赤痢アメーバに特異的に存在するメチオニン・システイン生合成経路の解析を行った。組換え酵素の基質特異性などの酵素学的解析を行い、今後阻害剤開発の際に重要となる基礎データを獲得した。更に、赤痢アメーバ分離株を分類し、病原性などとの関連性を検証するために赤痢アメーバ株のポリメラーゼチェーンリアクションによるタイピングに必要な方法を開発した。

A. 研究目的

アメーバ症に対し通常用いられる主な薬剤メトロニダゾールは嚢子排出者に対しては比較的無効とされる。赤痢アメーバの伝播を阻止するためには嚢子排出者を良い効率で治療することが不可欠である。そこで我々は新しい抗アメーバ症薬剤を開発することを目的として、赤痢アメーバに選択的に存在する硫黄含有アミノ酸代謝経路の解析を行った。

ほ乳類宿主においてはメチオニンは食物から取り込まれ、システインは逆トランスサルフリレーション経路によってメチオニンから合成される。一方、赤痢アメーバは細胞外の硫黄を同化し、システインを合成し、更に、トランスサルフリレーション経路によってメチオニンを合成する。この硫黄同化的システイン合成経路及びトランスサルフリレーション経路はほ乳類に存在しないため、合理的な薬剤標的である。本年度はトランスサルフリレーション経路の主要酵素であるシスタチオニンガンマ合成酵素とシスタチオニンベータリアーゼとをクローニングし、酵素学的解析を加えた。

一方、アイソエンザイム解析によち赤痢アメーバ種の中には少なくとも3種類の亜型が存在することが知られている。しかしながら、その亜型の多様性は実際には更に複雑であると想像され、赤痢アメーバ株のタイピング法の開発が必要となっている。そこで我々は、赤痢アメーバ株をポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)を用いたDNA多型解析により明らかにする方法を開発した。

B. 研究方法

1. シスタチオニン合成酵素・リアーゼのクローニング

赤痢アメーバのシスタチオニンガンマ合成酵素(CGS)・ベータリアーゼ(CBL)cDNAはESTデータベースの配列をもとに5'及び3'RACEにより獲得した。赤痢アメーバcDNAライブラリーはlamda ZAP Expressを用いて作製した。更に全長を赤痢アメーバのcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより獲得した。

2. 組換えCGS、CBLの作成

CGS、CGLはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)との融合蛋白としてを発現させた。CGS、CGLの

蛋白コード領域を PCRにより増幅した。用いた PCRの条件は denaturation, 94°C 1 min; annealing, 60°C 1 min; elongation, 72°C 1 min; 30 cycles であった。PCR産物を制限酵素で消化後、pGEX-2T-1 にクローニングし、発現ベクターpGST/ EhCGS、pGST/ EhCBLを得た。pGST/ EhCGS、pGST/ EhCBLで大腸菌株 DH5 α 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。細胞を生理的リン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。組換え蛋白はグルタチオンセファロース 4B カラムで精製した。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合蛋白はトロンピンで消化した後、分離精製し組換え EhCGS、EhCBL を得た。

3. 酵素アッセイ

CBL の活性の測定は β -elimination 又は γ -elimination によって生じる α -ketoacid を定量することにより行った。また、基質により生成した硫化水素、システイン、メタンチオールを同時に定量した。1 unit の活性は 25°C 1 分間に 1 μ mole の ketoacid を生成する酵素量と定義した。

4. 大腸菌欠損株を用いたレスキュー

大腸菌の CGS、CBL 欠損株 (met B, met C) を pGST/ EhCGS、pGST/ EhCBL で形質転換しメチオニン添加或いは欠損 M9 最小プレートで培養した。

5. 赤痢アメーバ株のタイピング法の開発

DNA は細菌共生培養株或いは無菌培養株から QIAamp Mini Stool DNA kit を用いて抽出した。PCRには以下のプライマーを用いた。R1, 5' CTGGTTAGTATCTTCGCCTGT 3'; R2, 5' CTTACACCCCCATTAACAAT 3'; R5, 5' CTAAAGCCCCCTTCTTCTAT 3'; R6, 5' GTGCTAATAACGCCAGGGTC 3'。PCRの条件は denaturation, 94°C 30 sec;

annealing, 45°C 30 sec; elongation, 72°C 1 min; 30 cycles でホットスタートを用いた。

(倫理面への配慮) 該当せず。

C. 研究結果

1. EhCGS、EhCBL 遺伝子のクローニング

赤痢アメーバからクローニングされた CGS、CBL cDNA のコードする蛋白はどちらもピリドキサルリン酸の保存した結合部位をもち、お互いに 64%の同一性を示した。EhCGS 及び EhCBL は他種由来のメチオニンリアーゼ (MGL)、CGS、CBL、シスタチオニンガンマリナーゼ (CGL) と 17-35%の同一性を示した。その中でトリコモナスの MGL と最も高い (34%) 同一性を示した。

2. 組換え CBL の解析

組換え EhCBL はメチオニン、シスタチオニン、O-アセチルセリンを基質として β -或いは γ -リアーゼ活性で ketoacid を生成した。しかしながら、システイン、ホモシステインは基質としなかった。従って、EhCBL はアミノ酸一次配列ではトリコモナス由来の MGL に優位な相似を示すが、基質特異性からは他種の CBL に似た性質を示すことが明らかとなった。

3. EhCBL のインビボでの機能

大腸菌の CGS、CBL 欠損株を pGST/ EhCBL 或いはコントロールプラスミドで形質転換しメチオニン添加或いは欠損 M9 最小プレートで培養したところ、メチオニン添加培地ではすべての形質転換体が増殖した。一方、メチオニンを除いた培地では pGST/ EhCBL をもった CGS、CBL 欠損株は増殖したのに対し、コントロールプラスミドをもった大腸菌株は増殖しなかった。pGST/ EhCBL をもった CBL 欠損株の増殖は pGST/ EhCBL をもった CGS 欠損株の増殖よりずっと速かった。

4. 赤痢アメーバ株のタイピング法

の開発

赤痢アメーバ分離株 13 株由来の抽出 DNA を R1/R2 及び R3/R4 のプライマーの組み合わせで PCR を行ったところ、R1/R2 の組み合わせで増幅される遺伝子座(Locus1/2)及び R5/R6 の組み合わせで増幅される遺伝子座(Locus5/6)の増幅パターンに株間の相違が見られた。アガロース電気泳動上で移動度の差として認められるだけでなく、シーケンスの結果、複数の 2-16 ヌクレオチドの反復配列が存在する遺伝子座であることが明らかとなった。更に詳細に解析した結果、これらの反復配列の回数と位置に株間の差異が存在し、これが電気泳動上の移動度の差異となっていたことが判明した。

D. 考察

我々が同定、解析した CGS、CBL はアメーバに選択的に存在する代謝経路（トランスサルフリレーション経路）の主要酵素であり、その解析は長期的には薬剤標的の開発のために有用と考えられる。

我々はリコンビナントシステイン合成酵素を用いて様々な酵素学的解析を行った。最も注目すべき結果はアミノ酸一次配列から想像された機能とインビトロ、インビボでの実際の機能の相反である。蛋白配列からは MGL と想像された EhCBL の機能は酵素学的解析からも大腸菌レスキューの結果からも CBL のそれと合致している。今後更に CGS との基質特異性の差異を明らかにしたい。

更に、本研究の大きなテーマの一つであるアメーバ株のサブポピュレーションの解析に関しても十分な発展を遂げた。即ち、赤痢アメーバ分離株を PCR によって多型解析する方法論がほぼ確立したといえる。来年度以降のわが国における分離株を用いたタイピングに役立つものと考えられる。

E. 結論

赤痢アメーバ特異的メチオニン合成経路の主要酵素の解析を行った。同時に、赤痢アメーバ株の遺伝的多型解析の方法を開発した。これらの成果は、今後の薬剤開発及び赤痢アメーバ分離株のタイピングに必要な基礎データを提供すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- i. Nozaki, T., Tokoro, M., Imada, M., Saito, Y., Abe, Y., Shiget a, Y., and Takeuchi, T. (2000) Cloning and biochemical characterization of genes encoding two isozymes of cysteine synthase from *Entamoeba dispar*. *Mol Biochem Parasitol* 107, 129-133.
- ii. Nagamune, K., Nozaki, T., Maeda, Y., Ohishi, K., Fukuma, T., Hara, T., Schwarz, R.T., Sütterlin, C., Brun, R., Riezman, H., and Kinoshita, T. (2000) Critical roles of glycosylphosphatidylinositol for *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 10336-10341.
- iii. Kubata, B. K., Duzenko, M., Kabututu, Z., Pawer, M., Szallies, A., Fujimori, K., Inui, T., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000) Identification of a novel prostaglandin F_{2α} synthase in *Trypanosoma brucei*. *J. Exp. Med.* 192, 1327-1338..
- iv. Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Tokoro, M., and Takeuchi, T. (2000) Characterization of a gene encoding cystathionine γ-synthase involved in methionine biosynthesis from *Entamoeba*. *Arch. Med. Res.* 31, S69-70.

- v. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Shigeta, Y., Nakazawa, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2000) Identification and characterization of Rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Res. 31, S155-156.
- vi. Nozaki, T. (2000) Current problems of Amebiasis in Japan and recent advances on amebiasis researches (Review) Jpn. J. Inf. Dis. 53, 229-237.
- vii. Nozaki T., Shigeta Y., Saito-Nakano Y., Imada M., and Kruger W.D. (2001) Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan haemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*: Isolation and molecular characterization of cystathionine β -synthase and serine acetyltransferase from trypanosoma. J. Biol. Chem. 276: 6516-6523.
- viii. Sanuki, J., Tokoro, M., Nozaki, T., Okuzawa, E., and Asai, T. (2001) Purification and identification of a major soluble 40-kDa antigen from *Entamoeba histolytica* and its use for serodiagnosis of chronic amebiasis. Parasitol. Int. 50, (in press)
- 和文
- i. 野崎智義 (2000) 赤痢アメーバの病原性因子の分子論的理解 現代医療 32 巻増刊 II 号 1280-1284.
- ii. 野崎智義 (2000) エコロジーと新興感染症 医学のあゆみ 195(13): 1082-1083.
- iii. 野崎智義 (2001) 医師が念頭にお輸入感染症の世界分布 今日の治療指針 医学書院 pp27-29.
2. 学会発表
- i. 野崎智義 (2000) 原虫におけるシステム生合成経路の生化学的・遺伝学的解析 第 69 回日本寄生虫学会大会、ワークショップ、松江
- ii. 斉藤由美子、繁田泰男、中沢幹、竹内勤、野崎智義 (2000) 赤痢アメーバにおける分泌機構の解析 第 69 回日本寄生虫学会大会、ワークショップ、松江
- iii. Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Imada, M., Nakazawa, M., Shigeta, Y., and Takeuchi, T. (2000) Cloning and characterization of a gene encoding protein phosphatase 2C from *Entamoeba histolytica*. International Symposium on Amoebiasis, Hamburg, Germany.
- iv. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Shigeta, Y., Nakazawa, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2000) Identification and characterization of Rab GTPases in *Entamoeba histolytica*. International Symposium on Amoebiasis, Hamburg, Germany.
- v. Nozaki, T., Nakano-Saito, Y., Tokoro, M., Shigeta, Y., Nakazawa, M., Asai, T., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Kruger, W. (2000) Sulfur amino acid metabolism in protozoa. 第 35 回日米合同会議、犬山、愛知
- vi. Kubata, B. K., Kabututu, Z., Inui, T., Fujimori, K., Nozaki, T., Yamashita, K., Horii, T., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000) Enzymatic formation of prostaglandin in *Trypanosoma brucei*. 第 73 回日本生化学会大会、横浜
- vii. 中野由美子、保田友義、繁田泰男、中沢幹、竹内勤、野崎智義 (2000) ファゴサイトーシスによって誘導される赤痢アメーバ Rab5 ホモログの

細胞内局在変化 第 73 回日本生化学会大会、横浜

- viii. 中野由美子、保田友義、繁田泰男、中沢幹、竹内勤、野崎智義 (2000) 赤痢アメーバ Rab5 ホモログのファゴサイトーシスへの関与 第 53 回日本細胞生物学会大会、福岡
- ix. 野崎智義、所正治、竹内勤、Warren Kruger (2000) 原生動物における硫黄含有アミノ酸の生合成 第 56 回日本寄生虫学会西日本支部大会、ワークショップ、名古屋
- x. Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Tokoro, M., and Takeuchi, T. (2000) Characterization of a gene encoding cystathionine γ -synthase involved in methionine biosynthesis from *Entamoeba*. The XIV Seminar on amebiasis, Mexico City, Mexico.
- xi. Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Shigeta, Y., Nakazawa, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2000) Identification and characterization of Rab5 homologue in *Entamoeba histolytica*. The XIV Seminar on amebiasis, Mexico City, Mexico.
- xii. Nozaki, T. (2000) Sulfur-amino acid metabolism in *Entamoeba*. The 3rd seminar on food-borne parasitic zoonoses: Food- and water-borne parasitic zoonoses in the 21st century, Bangkok, Thailand.

G. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得
該当せず。
- 2. 実用新案登録
該当せず。

別紙5 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|--------------------------|-------------------------|------------|------|-----|------|---------|
| 竹内 勤 | 赤痢アメーバ抗体 | 黒川清、春日雅人、北村聖 | 臨床検査データブック | 医学書院 | 東京 | 2000 | 442~443 |
| 竹内 勤 | 血中赤痢アメーバ抗体価 (間接蛍光抗体法) | 和田攻、大久保直行、永田直一、 矢崎義雄 | 臨床検査ガイド | 文光堂 | 東京 | 2000 | 898~902 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|--|----|---------------|------|
| Kobayashi, S., Imai, E., Fujiwara, T., Tachibana, H. and Takeuchi, T. | Cultivation of <u>Entamoeba</u> <u>dispar</u> : Growth promoting effect of ferredoxin | Archives of Medical Research | 35 | 209~ 210 | 2000 |
| Dvorak, J. A., Kobayashi, S., Abe, K., Fujiwara, T., Takeuchi, T. and Nagao, E. | The application of the atomic force microscope to studies of medically important protozoan parasites | Journal of Electron Microscopy | 49 | 429~ 435 | 2000 |
| Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. | Effect of dinitroaniline herbicides on the growth of <u>Entamoeba histolytica</u> | Journal of Parasitology | 86 | 607~ 610 | 2000 |
| Cheng, X-J and Tachibana, H. | Protection of hamsters from amebic liver abscess formation by immunizati- on with the 150- and 170-kD surface antigen of <u>Entamoeba histolytica</u> | Parasitology Research | | in press | 2001 |
| Tachibana, H., Kobayashi, S., Nagakura, K., Kaneda, Y. and Takeuchi, T. | Asymptomatic cyst passer of <u>Entamoeba histolytica</u> but not <u>Entamoeba dispar</u> | Parasitology International | | in press | 2001 |
| Cheng, X-J and Tachibana, H. | Molecular cloning and characterization of peroxiredoxin from <u>Entamoeba moshkovskii</u> | Archives of Medical Research | 31 | s65~ s66 | |
| Cheng, X-J, Watanabe, K., Ihara, S., Takekoshi, M. and Tachibana, H. | Bacterial expression of human monoclonal antibody that inhibits in vitro adherence of <u>Entamoeba</u> <u>histolytica</u> trophozoites | Archives of Medical Research | 31 | s311~ s312 | 2000 |
| Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X-J, Maeda, F., Aotsuka, S. and Ihara, S. | Bacterial expression of a neutralizing mouse monoclonal antibody Fab fragments to a 150-kilo- dalton surface antigen of <u>Entamoeba histolytica</u> | American Journal of Tropical Medicine and Hygiene | | in press | 2001 |

| | | | | | |
|--|---|------------------------------|----|-----------|------|
| Tachibana, H., Cheng, X-J, Kobayashi, S., Fujita, Y. and Uono, T. | <u>Entamoeba dispar</u> but not <u>E. histolytica</u> , detected in a colony of chimpanzees in Japan | Parasitology Research | 86 | 537~541 | 2000 |
| Cheng, X-J, Ihara, S., Takekoshi, M. and Tachibana, H. | <u>Entamoeba histolytica</u> : bacterial expression of a human monoclonal antibody which inhibits <i>in vitro</i> adherence of trophozoites | Experimental Parasitology | 96 | 52~56 | 2000 |
| Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. | Inhibition of encystation of <u>Entamoeba invadens</u> by wortmannin | Parasitology Research | | in press | 2001 |
| Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. | Effect of jasplakinolide on the growth, encystation and actin cytoskeleton of <u>Entamoeba histolytica</u> and <u>Entamoeba invadens</u> | Journal of Parasitology | | in press | 2001 |
| Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. | Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the encystation of <u>Entamoeba invadens</u> | Archives of Medical Research | 31 | s185~s186 | 2000 |
| Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. | Growth inhibition and actin aggregate formation of <u>Entamoeba histolytica</u> by jasplakinolide | Archives of Medical Research | 31 | s145~s146 | 2000 |
| Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. | <u>Entamoeba invadens</u> : Protein kinase C inhibitors block the growth and encystation | Experimental Parasitology | 95 | 288~290 | 2000 |
| Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. | Effect of antitubulin drug oryzalin on the encystation of <u>Entamoeba invadens</u> | Parasitology Research | 86 | 625~629 | 2000 |
| Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S. and Takeuchi, T. | Effect of cytochalasin D on the growth, encystation and multinucleation of <u>Entamoeba invadens</u> | Parasitology Research | 86 | 599~602 | 2000 |
| Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Shigeta, Y., Nakazawa, M., Takeuchi, T. and Nozaki, T. | Identification and characterization of Rab5 homologue in <u>Entamoeba histolytica</u> | Archives of Medical Research | 31 | s155~s156 | 2000 |
| Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Tokoro, M. and Takeuchi, T. | Characterization of a gene encoding cystathionine γ -synthase involved in methionine biosynthesis from <u>Entamoeba</u> | Archives of Medical Research | 31 | s69~s70 | 2000 |

| | | | | | |
|---|--|---|-----------|-----------|------|
| Nozaki, T., Tokoro, M., Imada, M., Saito, Y., Abe, Y., Shigeta, Y. and Takeuchi, T. | Cloning and biochemical characterization of gene encoding two isozymes of cysteine synthase from <i>Entamoeba dispar</i> . | Molecular and Biochemical Parasitology | 107 | 129~133 | 2000 |
| Pillai, D. R., Kobayashi, S. and Kain, K. K. | <i>Entamoeba dispar</i> galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin: Evidence for differential gene expression and conformational regulation | Archives of Medical Research | 31 | s234~s236 | 2000 |
| Nozaki, T. | Current problems of amebiasis in Japan and recent advances in amebiasis research | Japanese journal of Infectious Diseases | 53 | 229~237 | 2000 |
| 小林正規、所 正治、竹内勤 | 病原体別にみた迅速検査；赤痢アメーバ | 臨床と微生物 | 27 (増) | 152~155 | 2000 |
| 野崎智義 | 赤痢アメーバの病原性因子の分子論的理解 | 現代医療 | 32 (増) | 1280~1284 | 2000 |
| 竹内 勤 | 肝寄生虫症の疫学・分子医学 | 現代医療 | 32 (増) | 2849~2854 | 2000 |
| 竹内 勤 | 性感染症と寄生虫疾患 | Biomedical Perspectives | 9 | 73~77 | 2000 |

High prevalence of infection with *Entamoeba dispar*, but not *E. histolytica*, in captive macaques.

Tachibana H, Cheng XJ, Kobayashi S, Matsubayashi N, Gotoh S, Matsubayashi K.

Parasitol Res 2001 Jan;87(1):14-7

20000531

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。