

なった。先に我々は嚢子形成が細胞周期に依存していることを報告したが、嚢子形成の抑制機構としてプロテアソーム阻害剤がアメーバの細胞周期の調節に影響を与えていることが示唆された。 β -lactoneで処理した嚢子はそれを除去しても嚢子形

成の回復が認められなかったことから、この薬剤の処理により栄養型の嚢子形成能が失われると考えられた。プロテアソーム阻害剤により赤痢アメーバに多核化が起こることが明らかになり、細胞質分裂の抑制が示唆され、この過程へのプロテ

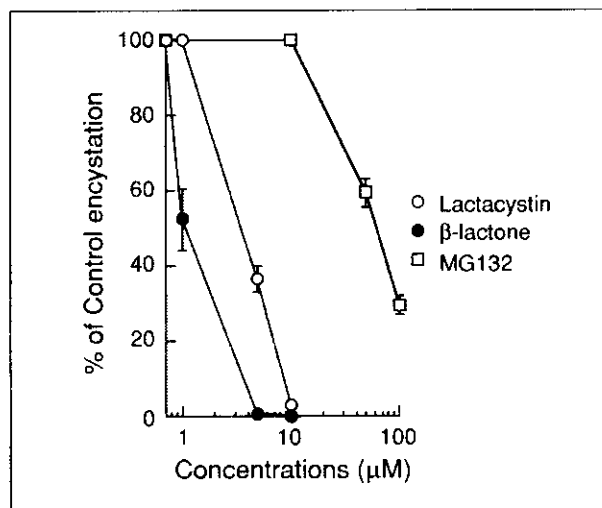


Fig. 6 Effect of proteasome inhibitors on the encystation of *E. invadens*

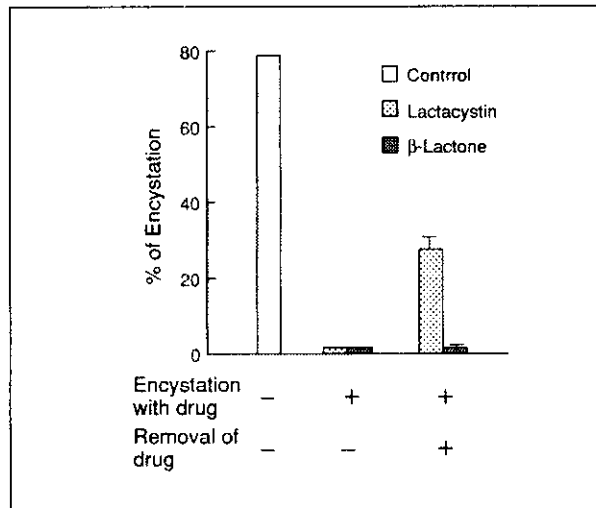


Fig. 7 Effect of removal of proteasome inhibitors on the encystation of *E. invadens*

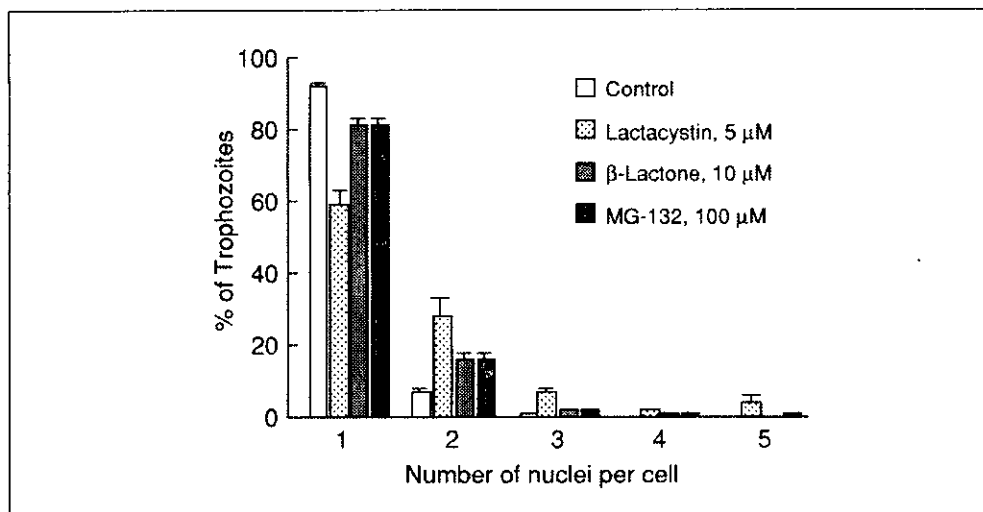


Fig. 8 Effect of proteasome inhibitors on multinucleation of *E. histolytica* trophozoites

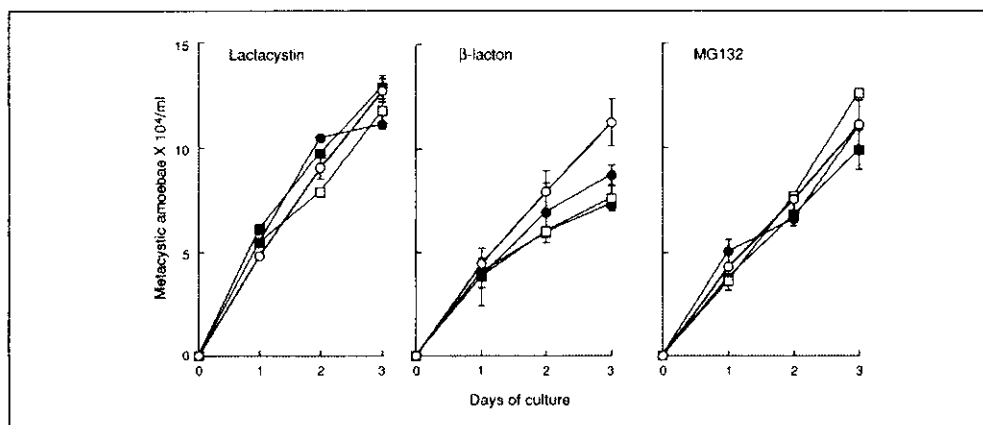


Fig. 9 Effect of proteasome inhibitors on the encystation and metacystic development of *E. invadens*

アソームの関与が示唆された。lactacystinで処理した赤痢アメーバの細胞質にグリコーゲン粒の蓄積が認められたことから、プロテアソームがグリコーゲン代謝にも関係していることが示唆された。高等動物のプロテアソームと寄生性原虫のプロテアソームとの違いが明らかにされつつあり、新たな薬剤開発の重要な標的になると考えられた。

結 論

アメーバの増殖および嚢子形成に細胞外 Ca^{2+} 、アメーバ虫体の Ca^{2+} flux、 Ca^{2+} チャンネルさらにカルモデユリンが関与していることが明らかになり、 Ca^{2+} 機能阻害剤の薬剤としての有用性が示唆された。また、細胞内蛋白質分解機構として重要なプロテアソームがアメーバの増殖および嚢子形成にも関与していることが明らかになり、新たな薬剤開発の重要な標的になることが示唆された。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

- 1) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Effect of jasplakinolide on the growth and actin cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. J. Parasitol. 87, 399-405. 2001.
- 2) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Inhibition of encystation of *Entamoeba invadens* by wortmannin. Parasitol. Res. 87, 371-375. 2001.
- 3) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Effect of calcium antagonists, calcium channel blockers and calmodulin inhibitors on the growth and encystation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. Parasitol. Res. 87, 833-837. 2001.
- 4) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. *Entamoeba invadens*: Enhancement of excystation and metacystic development by cytochalasin D. Exp. Parasitol. 98, 145-151. 2001.
- 5) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Effect of proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. Parasitol. Res. 2002. in

press

- 6) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. J. Parasitol. 2002. in press

2. 学会発表

- 1) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. *Entamoeba invadens*の増殖、シスト形成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70回日本寄生虫学会大会. 山形. 2001年4月.
- 2) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. プロテインキナーゼC阻害剤による *Entamoeba invadens*の増殖およびシスト形成の抑制. 第70回日本寄生虫学会大会. 山形. 2001年4月.
- 3) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T. Enhanced excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by cytochalasin D. 11th International Congress of Protozoology. Salzburg. 2001年7月.
- 4) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内勤. Cytochalasin Dによる *Entamoeba invadens*の脱嚢促進. 第41回日本熱帯医学会大会. 東京. 2001年9月.
- 5) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内勤. *Entamoeba invadens*の増殖および嚢子形成へのシグナル伝達分子の関与. 第41回日本熱帯医学会大会. 東京. 2001年9月.
- 6) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内勤. *Entamoeba*の増殖および嚢子形成へのカルシウムイオンの関与. 第61回日本寄生虫学会東日本大会. 東京. 2001年10月.
- 7) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内勤. Cytochalasin Dによる *Entamoeba invadens*の脱嚢促進. 第34回日本原生動物学会大会. 神戸. 2001年11月.
- 8) 牧岡朝夫, 熊谷正広, 大友弘士, 小林正規, 竹内勤. *Entamoeba*の増殖、嚢子形成および脱嚢に及ぼすプロテアソーム阻害剤の効果. 第71回日本寄生虫学会大会. 伊勢原. 2002年3月.

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



無症候性嚢子排出者由来の 抗赤痢アメーバ人工抗体の作製

橋 裕司¹⁾、程 訓佳¹⁾、竹内 勤²⁾

¹⁾ 東海大学医学部感染症学部門

²⁾ 慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫学教室

研究要旨

赤痢アメーバに感染していながら症状を呈さない無症候性嚢子排出者は、有症者ほど高い抗体価を示さないものの、赤痢アメーバの腸粘膜への侵襲を防御できる抗体を保有している可能性が高い。無症候性嚢子排出者の末梢リンパ球に由来する抗体遺伝子ライブラリーを構築し、抗赤痢アメーバヒトモノクローナル抗体Fab断片の大腸菌による作製を試みた。コロニープロット法と間接蛍光抗体法でスクリーニングを行い、虫体表面と反応する1クローン(CP-33)を選別した。さらに、CP-33のH鎖に別のL鎖を組み合わせた3クローンを選別した。これら4クローンはいずれも赤痢アメーバの260-kDa Gal/GalNAc レクチンのcysteine-richドメインを認識していた。これらの抗体で赤痢アメーバ栄養型虫体を前処理してCHO細胞と反応させたところ、接着が有意に抑制された。また、同様に抗体で前処理した虫体では赤血球貪食能が有意に抑制された。抗体価の低い無症候性嚢子排出者の僅かな末梢血液からでも、接着中和活性のあるヒト抗体を効率よく作製できることが示された。

分担研究者：竹内 勤

研究協力者：橋 裕司、程 訓佳

Recombinant human monoclonal antibodies specific for *Entamoeba histolytica* prepared from peripheral lymphocytes of an asymptomatic cyst passer

Hiroshi Tachibana¹⁾, Xun-Jia Cheng¹⁾ and Tsutomu Takeuchi²⁾

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

研究目的

赤痢アメーバ症は、わが国では特に男性同性愛者における性行為感染症として注目されている。最近では HIV との混合感染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。HIV 感染者では赤痢アメーバ症が重症化することも考えられ、日和見感染症の一つとして考慮する必要がある。

赤痢アメーバの感染は虫体が腸粘膜に接着することによって成立し、虫体が宿主細胞を傷害する際にも接着は必須の過程である。接着に関与する因子として、アメーバ虫体表面に存在する Gal/GalNAc レクチンが知られている。従って、レクチンに対するヒト抗体を作製できれば、赤痢アメーバ症の治療や予防に応用できる可能性がある。

そこで我々は、感染者の末梢リンパ球から増幅した抗体遺伝子を用い、大腸菌で抗体 Fab 断片を産生させることを試みている。これまでに、抗体価の高いアメーバ性肝膿瘍患者の末梢リンパ球から抗体遺伝子ライブラリーを構築することで、赤痢アメーバの接着を阻止できるような抗体を作製している。今年度は、赤痢アメーバに感染しながら症状を呈さない無症候性嚢子排出者由来のヒト抗体 Fab 作製を試みた。

研究方法

1. 抗体遺伝子ライブラリーの構築

無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者の末梢血液約 10ml からリンパ球を分離し、RNA を単離した。既知の抗体遺伝子の塩基配列に基づいて設計したプライマーを用い、抗体 L 鎖 (κ, λ) の全領域と H 鎖 (γ, μ) の Fd 領域をコードする遺伝子をそれぞれ増幅した。発現ベクター pFab1-His2 の 2 つのクローニング部位に、増幅された遺伝子断片をそれぞれ組み込んで大腸菌 JM109 に導入し、抗体遺伝子ライブラリーを構築した。

2. 抗赤痢アメーバ抗体産生クローンのスクリーニング

寒天プレートに形成させた大腸菌コロニーをニトロセルロース膜に移し、isopropyl- β -D-

thiogalactopyranoside を含むプレートの上に置いて 30℃ で 6 時間発現を誘導した。菌を溶解した後、赤痢アメーバ HM-1:IMSS 株粗抽出抗原、バルオキシダーゼ標識したアメーバ性肝膿瘍患者由来の抗体、基質を順次反応させ、陽性クローンをスクリーニングした。陽性クローンについては、ホルマリン固定虫体を用いた間接蛍光抗体法で 2 次スクリーニングを行った。

3. 抗体 Fab 断片の精製

陽性クローンを 1L の SB 培地で培養した。His 結合レジンを用いたアフィニティクロマトグラフィーによって Fab を精製した。

4. 赤痢アメーバ抗原との反応性の検討

ELISA とウェスタンブロットには HM-1:IMSS 株の粗抽出抗原を用いた。ドットブロットには、バージニア大学の Dr. Petri より供与された 260-kDa レクチンと組み換え型の rLecA (170-kDa heavy subunit の cysteine-rich domain を含む) を用いた。

5. 赤痢アメーバの接着能に対する抗体の効果

赤痢アメーバ栄養型虫体 (10^4) を 100 μ g の抗体によって 4℃ で 1 時間前処理した後、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞と 4℃ で 2 時間反応させた。固定染色後、少なくとも 3 個の CHO 細胞が接着したアメーバの比率を計測した。

6. 赤痢アメーバの赤血球貪食能に対する抗体の効果

赤痢アメーバ栄養型虫体 (10^4) を 100 μ g の抗体によって 37℃ で 10 分間前処理した後、ヒト赤血球と 37℃ で 2 分間反応させた。固定染色後、赤血球を貪食したアメーバの比率と貪食された赤血球数を計測した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施計画については東海大学医学部医の倫理委員会で審議され承認されている。

研究結果

無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者由来の抗体遺伝子ライブラリー (CP-library) について、約 6×10^4 個のクローンをニトロセルロース膜上でスクリーニングし、6個の陽性クローンを得た (Table 1)。陽性クローンについて間接蛍光抗体法による2次スクリーニングを行い、虫体表面と反応する1クローン (CP-33) を選別した。さらに、CP-33のL鎖、H鎖遺伝子のそれぞれについて、他方をCP-libraryおよび肝膿瘍患者由来の抗体遺伝子ライブラリー (LA-library) の遺伝子と reshuffling して再スクリーニングを行い、L鎖とH鎖のよりよい組み合わせを検索した。その結果、新たに多数の陽性クローンが得られた (Table 1)。比較的反応性が強く、制限酵素切断パターンが異なる18クローンについて、ELISAで赤痢アメーバ抗原に対する反応性を

比較したところ、L鎖遺伝子を reshuffling して得られた3クローン (CP-L17, CP-L26, LA-L22) が、CP33よりも高い値を示した (Table 2)。CP-33を含む19クローンについて塩基配列を決定し、V領域のアミノ酸配列を明らかにした (Figs. 1 & 2)。反応性の強かった4クローンについては大量培養し、Fabを精製した (Fig. 3)。認識している抗原の分子量についてウェスタンブロットで解析したところ、260-kDaであった。さらに、ドットブロットによる解析を行った結果、いずれの抗体も、260-kDaレクチンを構成する2つのサブユニットのうち、170-kDa heavy subunitのcysteine-rich domainを認識していた (Fig. 4)。そこで、これらの抗体で赤痢アメーバ栄養型虫体を前処理してCHO細胞と反応させたところ、接着が有意に抑制された (Table 3)。また、同様にこれらの抗体で前処理した虫体では、赤血球貪食能が有意に抑制された (Table 4)。

Table 1, Source and reactivity of human monoclonal natibody Fab fragments to *Entamoeba histolytica*

H chain	L chain	No. of colonies screened	No. of positives	Percentage
CP-Library	CP-Library	63.2×10^3	6	0.0095
LA-Library	LA-Library	50.0×10^3	27	0.054
CP-33	CP-Library	26.3×10^3	249	0.96
CP-33	LA-Library	1.2×10^3	23	1.92
CP-Library	CP-33	8.5×10^3	4	0.047
LA-Library	CP-33	8.3×10^3	16	0.19

Table 2 ELISA reactivity of human monoclonal antibody Fab fragments, obtained by re-shuffling of H and L chains, to *Entamoeba Histolytica*

H chain	L chain	Relative OD
CP-33H	CP-33L	1.0
CP-33H	CP-L9	0.77
CP-33H	CP-L13	0.51
CP-33H	CP-L17	1.61
CP-33H	CP-L26	1.26
CP-33H	LA-L2	0.38
CP-33H	LA-L3	0.82
CP-33H	LA-L8	0.58
CP-33H	LA-L10	0.48
CP-33H	LA-L11	1.01
CP-33H	LA-L12	0.71
CP-33H	LA-L14	0.48
CP-33H	LA-L18	0.98
CP-33H	LA-L22	1.42
CP-H1	CP-33L	0.95
CP-H4	CP-33L	0.91
CP-H5	CP-33L	0.83
CP-H6	CP-33L	0.71
LA-H5	CP-33L	0.95

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
CP-33L	DIVMTQTPSSLSASVGDRTVITC	RASQSISSYLN	WYQQRPGQAPKLLIY	AASSLQS	
CP-L17	A.Q...S.....K..K.....	
LA-L22	..E...S.....K..K.....	
CP-L26	..QL.S...V.....	...G...W.A...K..K.....	
LA-L18	A.QL.S...T.....	...VTP.....K..K.....	S.....	
CP-L9	..EL.S...T.....	...G...W.A...K..K.....	
LA-L11	A.QL.S...S.....	...V.TF.S...K..K.....	
LA-L12	E..L.S...YV.....	...G.GRW.G...	..HK...N....	...T..G	
LA-L3	..L.S...V.....	...G...W.A...K..K.....	
CP-L13	..Q...S...V...T.....	...T.....K..K...V...	
LA-L8	..S...V...A.....	...G...NW.A...K..K...N..F	...T..T	
LA-L10	..S...V...A.....	...G...NW.A...K..K.....	
LA-L14	A.QL.S...A...E.....	...G.NNW.G...K..K.....	
LA-L2	..Q...S...V.....	...G...RW.V...K..K.....	G..T...	
LA-01L	..L.S...V.....	...S.....K..K.....	
	FR3	CDR3	FR4	Family	
CP-33L	GVPSRFGSGSGTDFTLPISSLQPEDFATYYC	QQSYSTPRTF	GQGTRLDIKR	Vk1	
CP-L17H..K.E...	Vk1	
LA-L22KVE...	Vk1	
CP-L26ANNF.....KVE...	Vk1	
LA-L18S.....I.....E.....	Vk1	
CP-L9AN.F.L...	..G..KVE...	Vk1	
LA-L11A.....I.Y...K.E...	Vk1	
LA-L12S.A.....	..AN.F.....	Vk1	
LA-L3S.S.....	..TN.F.I...	Vk1	
CP-L13KVE...G	Vk1	
LA-L8AH.I.L...	..G..KVE...	Vk1	
LA-L10A.....Y.....	Vk1	
LA-L14N.F.....KVE...	Vk1	
LA-L2N.....	..H.....	..TD.L.L...	Vk1	
LA-01LL.....I.L.....	Vk1	

Fig. 1 Deduced amino acid sequences of light chain V-genes

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
CP-33H	EVKLMESGGGVQGRSLRLS	CAASGFRFS	TYAIH	WVRQAPGKGLEWVA	RISHDGSQTHYADSVQG
CP-H4	D.Q.Q.....
LA-H5
CP-H5	...LQ.....V.....	TVN	SNHMSS I.YSA-GI.Y.....K.
CP-H1	Q.Q.K.....	L.K..G.....	T..	DFSMNS S.TATSVYLK.....R.
CP-H6	...L....	DLL..G.....	T..	MNS Y..SGSGTIY.....K.
LA-01H	Q.Q.VQ.....EV..	IT.K	G.PM.V..N..RNED.....K.

	FR3	CDR3	FR4	Family		
CP-33H	RFGVSRDNSNYTAYVQLNSLR	PDDTAVYFCAR	AYSSTP---DYGMDV	WGQGTAVIVSS	MISC	
CP-H4	MISC	
LA-H5	MISC	
CP-H5	..TI.....	EN.LFL.M....	E.....Y...	GKY.PS--IG.YF.YL.....	MISC
CP-H1	..TI.....	DNSV.L.MTNVSGE.....	Y...	DGGGKAASGY.....T.....	VH6
CP-H6	..TI.....	AKNSVSL.M....	GE.....Y...	GPRFEM----APF.YL.....	VH6
LA-01H	..TI.....	N.L.L.M....	TAE...L....	STGRRY-----Y....	..K..T.....	VH6

Fig. 2 Deduced amino acid sequences of heavy chain V-genes

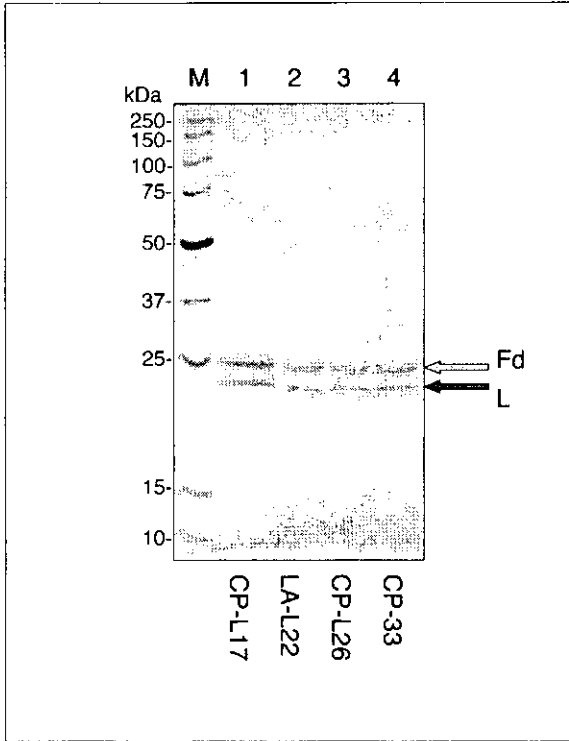


Fig. 3 SDS-PAGE of purified recombinant Fabs

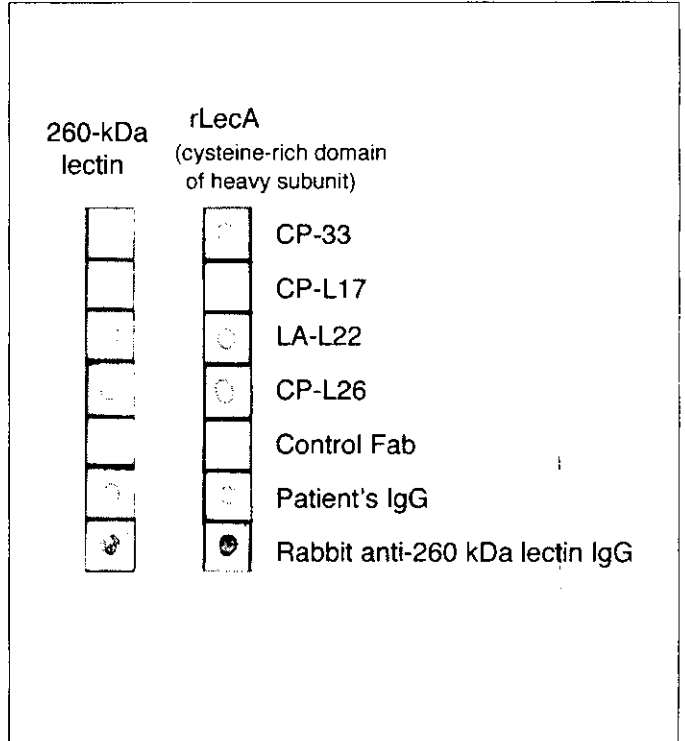


Fig. 4 Dot blot analysis of recombinant Fabs

Table 3 Effects of recombinant Fabs on the adherence of *Entamoeba histolytica* to CHO cells

Fab (100 μ g)	% Adherence (Mean \pm SD)	P (vs control)
Control	54.9 \pm 9.4	
CP-33	20.3 \pm 3.7	< 0.005
CP-L17	19.0 \pm 6.8	< 0.01
LA-L22	22.9 \pm 3.4	< 0.01
CP-L26	22.2 \pm 5.7	< 0.01

Table 4 Effects of recombinant Fabs on erythrophagocytosis by *Entamoeba histolytica*

Fab (100 μ g)	% of amoeba with RBC	P (vs control)	No. of RBC per amoeba	P (vs control)
Control	70.2 \pm 6.0		2.40 \pm 0.57	
CP-33	35.0 \pm 6.1	< 0.001	0.64 \pm 0.17	< 0.01
CP-L17	36.9 \pm 3.5	< 0.002	0.70 \pm 0.07	< 0.01
LA-L22	38.5 \pm 7.8	< 0.005	0.76 \pm 0.15	< 0.01
CP-L26	46.8 \pm 6.2	< 0.01	1.07 \pm 0.25	< 0.05

考 察

赤痢アメーバに感染していながら無症状に経過し、糞便中に嚢子を排出し続ける無症候性嚢子排出者では、赤痢アメーバの腸粘膜への侵襲を防御できる抗体を保有している可能性が高い。しかしながら、無症候性嚢子排出者の血清抗体価は、肝膿瘍患者などの有症者に比べると遙かに低い。Table 1 に示されたように、抗体遺伝子ライブラリーからの1次スクリーニングにおいて、CP-libraryの陽性率はLA-libraryに比べて低かった。しかし、reshufflingを行うことで、多数の陽性クローンが効率よく得られることが判明した。特に、H鎖が固定された場合の陽性率が高いことから、H

鎖の反応性がより重要であることが示唆された。精製された4クローンは、いずれも260-kDaレクチンのcysteine-rich domainを認識しており、接着中和活性が認められたが、その活性は以前に作製した150-kDaレクチンを認識するマウス抗体Fabに比べて低いものであった。従って、さらに活性の高いクローンを得るためにスクリーニングを続けていくことが必要である。また、Table 2とFig. 1に示された結果から、CDRの1アミノ酸の違いによって抗原との反応性が異なることが確認された。CDRに人為的な変異を導入することで、活性の高い抗体への改変も可能であると考えられる。

結 論

無症候性赤痢アメーバ嚢子排出者由来の抗体遺伝子を用い、赤痢アメーバの宿主細胞への接着を阻止するヒト抗体 Fab を大腸菌で作製できた。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表

- 1) Cheng, X.-J., Hughes, M. A., Huston, C. D. et al. Intermediate subunit of the Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* is a member of a gene family containing multiple CXXC sequence motifs. *Infect. Immun.*, 69(9): 5892-5898, 2001

2. 学会発表

- 1) 橋 裕司他. 無症候性嚢子排出者由来の抗赤痢アメーバ人工抗体の作製. 第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会. 2001年4月
- 2) Tachibana, H. et al. Recombinant human monoclonal antibody Fab fragments specific for *Entamoeba histolytica* prepared from peripheral lymphocytes of an asymptomatic cyst passer. XI International Congress of Protozoology. July, 2001.
- 3) 橋 裕司他. 赤痢アメーバに特異的でアルカリフォスファターゼ活性を有する組換え型ヒトモノクローナル抗体の作製. 第42回日本熱帯医学会大会. 2001年9月

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- (1) 特許取得
特になし
- (2) 実用新案登録
特になし
- (3) その他
特になし



トキソプラズマ特異酵素(NTPase)の 活性阻害物質の検索

浅井 隆志¹⁾、野崎 智義²⁾、仙道富士郎³⁾

¹⁾慶應義塾大学医学部熱帯医学寄生虫学教室

²⁾国立感染症研究所寄生動物部

³⁾山形大学

研究要旨

エイズ患者に多発する急性トキソプラズマ症の治療薬の開発の目的で、トキソプラズマに特異的に存在する酵素(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)の阻害剤の検索を行った。平成8年度に概要について報告したが今回はその化学構造を報告する。約15万の化合物をスクリーニングして構造的に関連のない5種類の化合物がNTPase活性を強力に阻害することがわかった。これらの化合物は全てインビトロでのトキソプラズマ虫体の増殖を阻害した。増殖を50%阻害するIC50値は5から50 μ Mであった。最も虫体の増殖を阻害した化合物は2-phenylthio indoleであった。そこでこの化合物の関連化合物による酵素活性および虫体増殖に及ぼす効果を調べた。その結果、これらの化合物によるNTPaseアイソザイムに対する阻害の機構が違うこと、フェニール環とインドール環共に阻害に重要であることがわかった。

分担研究者：仙道富士郎

研究協力者：浅井隆志、野崎智義

Identification of inhibitors of nucleoside triphosphate hydrolase in *Toxoplasma gondii*

Takashi Asai¹⁾, Tomoyoshi Nozaki²⁾ and Fujiro Sendo³⁾

¹⁾Department of Tropical Medicine and parasitology, School of Medicine, Keio University, ²⁾Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases and ³⁾Yamagata University

研究目的

トキソプラズマ症はエイズ患者及び臓器移植患者に多発する難治性の原虫感染症である。一度感染すると一生慢性的に感染しているためヒトへの感染率は非常に高い。現在使用されている治療薬は治療効果が低く副作用も強いことから、より治療効果の高い副作用のない薬剤が求められている。

我々は従来の研究によって他の生物には見られないトキソプラズマ及び近縁の原虫であるネオスポーラに特異的に存在する酵素を発見し、その性質から NTPase と命名している^{1,2)}。トキソプラズマの NTPase には二つのアイソザイム (NTPase-I 及び NTPase-II) が存在する。NTPase-II はトキソプラズマ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。この両アイソザイムは 603 個のアミノ酸配列の内わずかに 15 のアミノ酸配列しか違わないが、ADP に対する基質特異性は全く異なっている。過去の研究結果より、NTPase の特異的阻害剤はトキソプラズマの増殖を阻害することから、治療薬の絶好のターゲットとなると考えられる。

本研究の目的は、この NTPase を標的にしたトキソプラズマ症の新規治療薬の開発を行う原資とするために、その阻害剤について検討する事である。

研究方法

a. 原虫の培養

トキソプラズマ 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。増殖した急増虫体は 3 μ m 径のフィルター (Nucleopore) で分離する記載の方法³⁾で集め、使用時まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

b. 酵素の精製

凍結保存してあるトキソプラズマ RH 株の急増虫体 (2 g) を 10ml 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 の精製、酵素反応液の組成、活性の測定は記載の方法¹⁾で行った。

c. 酵素活性の阻害実験

96 穴のマイクロタイタープレートとの 1 穴あたり最終 0.1 ml になるように反応液を以下のように調整し酵素反応を行った。反応液には 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 0.2 mM (NTPase-I 用) あるいは 0.5 mM (NTPase-II 用) ATP, ATP 濃度の 5 mM 過剰の酢酸マグネシウム、5 mM ジチオスレイトール (DTT)、酵素 (NTPase-I あるいは NTPase-II) および各種濃度の被検化合物が含まれる。DTT を含まない反応液を 10 分間 37 度で保温した後、DTT を加えて酵素を活性化することで反応を開始した。これらの操作は全自動のロボット (Merk 社) を用いて行った。

d. トキソプラズマ虫体の増殖阻害実験

大腸菌のベータガラクトシダーゼ遺伝子を含むプラスミドを構築し、トキソプラズマの急増虫体に電気的に導入した。遺伝子が導入されたトキソプラズマ虫体をクローニングした後、安定的にベータガラクトシダーゼを発現する株をさらに選択した。選択された株はベータガラクトシダーゼの活性と細胞数が非常に良く相関する。ヒトの繊維芽細胞 (HFF) を敷き詰めた 96 穴のマイクロタイタープレートとの 1 穴あたり最終 0.1 ml になるようにトキソプラズマの培養液を調整した。この培養液の組成は、10% の胎児血清を含む MEM をベースに、各種濃度の被検化合物と一千個体のトキソプラズマ急増虫体である。培養後 48 および 72 時間後にベータガラクトシダーゼの活性を測定し、増殖したトキソプラズマ虫体数を標準曲線を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

該当せず。

研究結果

約15万の化合物をスクリーニングして5種類の化合物がNTPaseの活性を阻害することが判明した。これらの化合物の構造と化学名が図1に示されている。化合物2以外の4種類の化合物によるNTPaseアイソザイムに対するそれぞれの阻害(IC50)はほぼ同様であった(表1)。NTPase-Iに対する化合物2によるIC50値はNTPase-IIに対するそれよりも20倍近く低かった(表1)。今回の研究で見つかった5種類の化合物は全てインビトロでの虫体の増殖を抑制し、そのIC50値は7~50 μ M

であり酵素に対するIC50値より幾分高い傾向が見られた(表1)。またこれらの化合物単独ではヒト繊維芽細胞に毒性は示さず、これらの化合物は虫体の増殖に直接作用していることが示唆された。

これら5種類の化合物のうち最も虫体の増殖の抑制に効果的な化合物は化合物5の2-phenylthio indoleであったので、インドール環を持つ関連化合物について更に検討を加えた。これらの化合物の構造と化学名が図2に示されている。また酵素活性に対するIC50値、Ki値、虫体の増殖に対するIC50値が表2にまとめてある。化合物6である1H-indole, 2-((3-nitrophenyl)thio)-は2-phenylthio indoleの

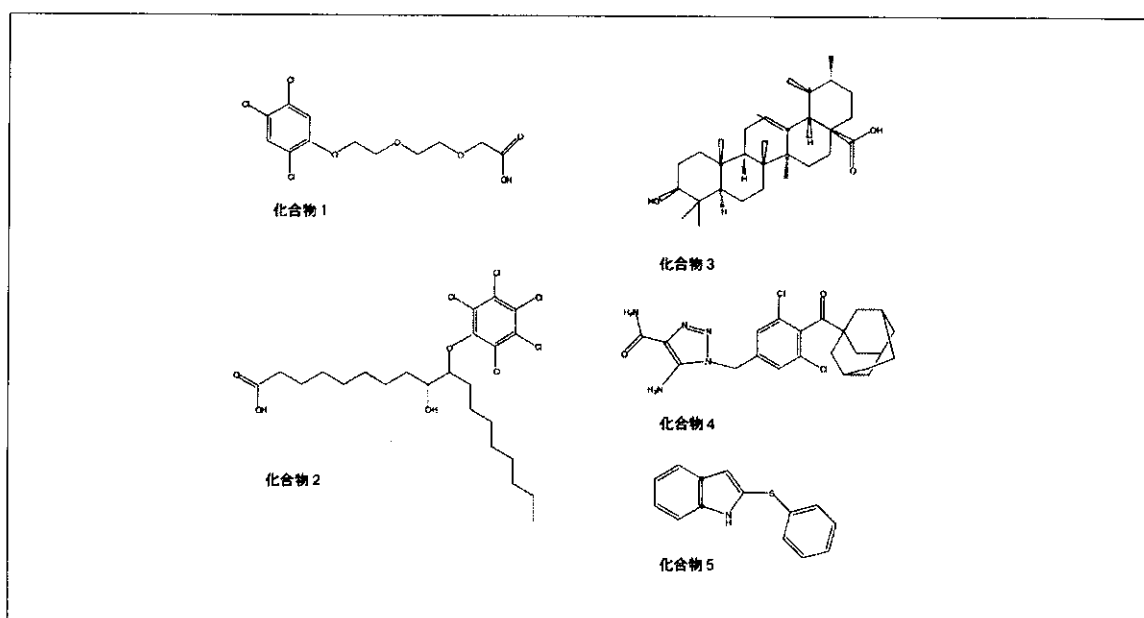


図1 スクリーニングにより得られた5種類の阻害剤の化学構造

2-(2-(2-(2,4,5-trichlorophenoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)acetic acid (化合物1)、9-hydroxy-10-(pentachlorophenoxy)stearic acid (化合物2)、ursolic acid (化合物3)、1-H-1,2,3-triazole-4-carboxamide, 5-amino-1-((3,5-dichloro-4-(tricyclo(3.3.1.1.3,7)dec-1-ylcarbonyl)phenyl)methyl)- (化合物4)、2-phenylthio indole (化合物5)

表1 スクリーニングにより見つかった化合物のNTPase活性の阻害

化合物	分子量 ^a	IC50 (酵素) ^b		IC50 (原虫増殖) ^b
		NTPase-I	NTPase-II	
化合物1	343	1.0	0.6	21.0
化合物2	1,129	0.1	2.0	29.0
化合物3	456	0.6	2.0	50.0
化合物4	448	20.0	15.0	37.0
化合物5	225	4.5	2.0	7.0

^a分子量: Da

^b数値は μ M

ベンゼン環のC-3の位置にNO₂-を加えたものであるが、NTPaseの活性は強力に阻害するが、虫体の増殖抑制効果は6倍近く減少した。また 2-phenylthio indoleの硫黄部分に反応性のない酸素を結合させた化合物8は全ての効果が消失した。化合物5のベンゼン環のC-4の位置にNO₂-を加えた2-(4-nitrophenylthio) indole (化合物 11) は全ての効

果の減少が見られた。このC-4の位置を反応性のある酸素に置き換えた化合物7, 1H-indole, 2-((4-methoxyphenyl)thio)-でも同様に全ての効果の減少が見られた。化合物11のインドール環に反応性の硫黄原子を加えた3-methylthio-2-(4-nitrophenylthio) indole (化合物12) も同様に全ての効果の減少が見られた。

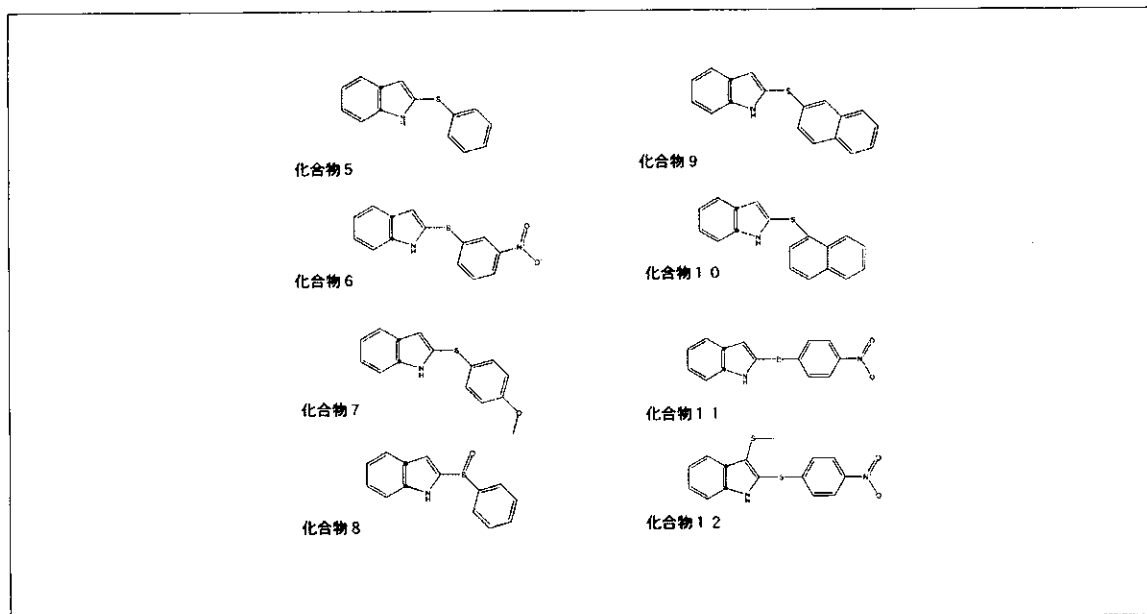


図2 2-phenylthio indole とその関連化合物の化学構造

2-phenylthio indole (化合物5)、1H-indole, 2-((3-nitrophenyl)thio)- (化合物6)、1H-indole, 2-((4-methoxyphenyl)thio)- (化合物7)、3-phenylsulfenyl indole (化合物8)、1H-indole, 2-(2-naphthalenylthio)- (化合物9)、1H-indole, 2-(1-naphthalenylthio)- (化合物10)、2-(4-nitrophenylthio) indole (化合物11)、3-methylthio-2-(4-nitrophenylthio) indole (化合物12)

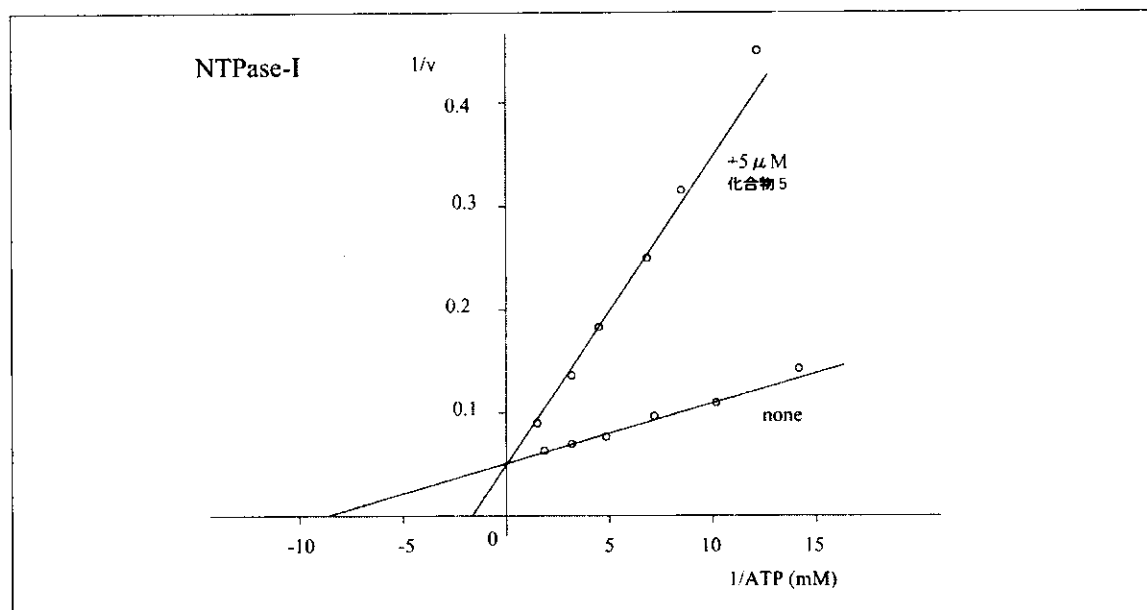


図3 化合物5の存在下(5 μ M) および非存在下におけるNTPase-IのLineweaver-Burkのプロット。拮抗阻害。

化合物5のベンゼン環をナフタレン環に変換した1H-indole, 2-(1-naphthalenylthio)- (化合物10)は酵素活性の阻害効果と虫体の増殖抑制効果が観察され、ナフタレンのC-2の位置にインドール環が結合した1H-indole, 2-(1-naphthalenylthio)- (化合物9)も同様の効果があった。

表2に示される化合物による酵素活性の阻害の機構を調べたところ、アソザイムにより阻害機構が異なることが判明した。NTPase-II活性の阻害には化合物によるプレインキュベーションが必須であるが、NTPase-Iの阻害にはそれらの操作を必要としない。化合物5を加えた条件下で基質濃度

を変化させたときの逆数プロットがそれぞれ図3 (NTPase-I)と図4 (NTPase-II)である。化合物5はNTPase-Iに対して基質との拮抗阻害効果があるが、NTPase-IIに対しては非拮抗阻害効果を示した。

考 察

今回の研究で約15万の低分子化合物をスクリーニングして5種類のお互いに関連性のない化合物がNTPaseの活性を阻害することが判明した。これらの化合物はふたつのNTPaseアソザイム活性を阻害すると同時に、虫体の増殖も抑制した。ま

表2 インドール化合物のNTPase活性の阻害とトキソプラズマ原虫の増殖抑制

化合物	分子量 ^a	IC50 (酵素) ^b		Ki NTPase-I	IC50 (原虫増殖) ^b
		NTPase-I	NTPase-II		
化合物5	225	4.5	2.0	1.5	7.0
化合物6	270	3.2	2.3	1.4	44.0
化合物7	255	26.2	26.9	11.2	17.2
化合物8	241	50.0	50.0	50.0	50.0
化合物9	275	7.2	3.1	14.5	3.6
化合物10	275	1.3	1.3	0.6	3.2
化合物11	270	23.2	17.7	10.0	13.7
化合物12	316	27.3	25.4	11.9	17.2

^a分子量:Da
^b数値は μM

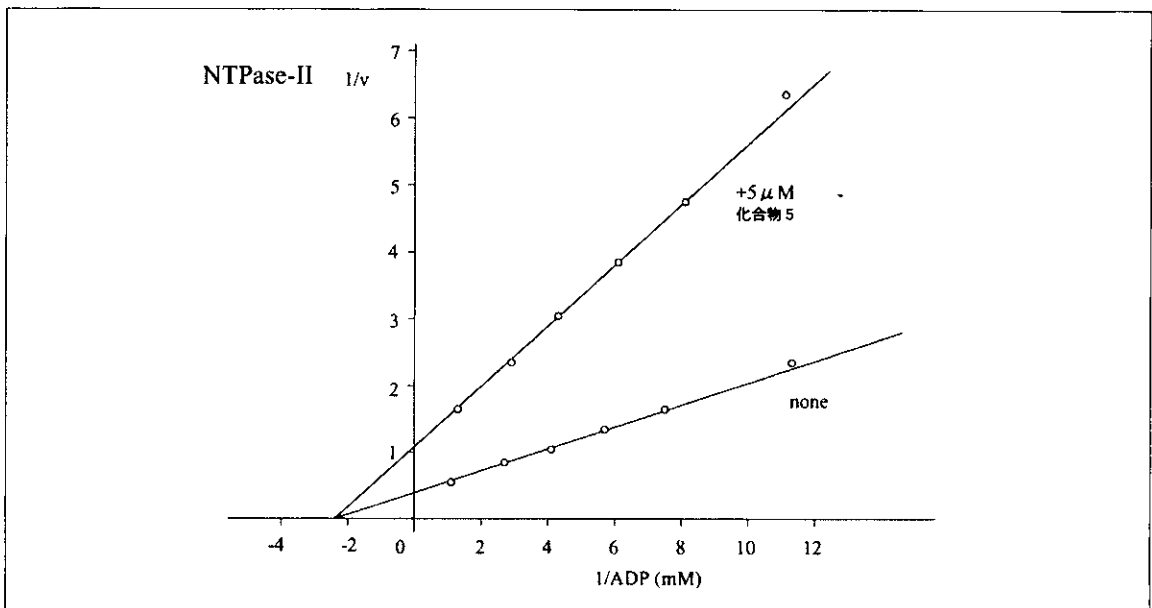


図4 化合物5の存在下(5mM)および非存在下におけるNTPase-IIのLineweaver-Burkのプロット 非拮抗阻害

たこれらの化合物はE-型ATPaseの阻害剤として知られていないばかりか、その他のATPase類の阻害剤としても知られていない新規のものである。その中でも化合物5とその関連化合物による酵素活性の阻害に関する今回得られた知見は、NTPaseの三次構造および生物学的役割の解明に大いに役立つだろう。さらに関連化合物を検討することは、トキソプラズマ症の新規の治療薬の開発につながる可能性があると考えられる。

ふたつあるアイソザイムの活性に対する阻害効果で化合物2だけが20倍も違うIC50値を示した。このことは両アイソザイムの基質に対する認識の違いが反映された結果と考えられる。特にNTPase-Iは強力なヌクレオシド三リン酸ヒドロラーゼであり、NTPase-IIのような古典的アピラーゼとは異なることから、反応機構の解明に化合物2は重要な知見をもたらす可能性がある。これらの知見はATPase類の反応機構の解明、特にヌクレオチドの結合部位との関連において重要であると考えられる。なぜならば、両アイソザイムの反応機構の違いは今まで知られたATPase類のヌクレオチドの結合部位とは異なる部位の関与⁵⁾が考えられるからである。また今回の研究で化合物による阻害機構がアイソザイムごとに異なることが判明した。ヌクレオチドの結合部位との関連から今回の結果は同じように、酵素の三次構造の解明に重要な手がかりを与えるであろう。

今回見つかった5種類の化合物のうち化合物3(Ursolic acid)は各種の酵素の阻害剤として知られている。それらの酵素はアデノシンデアミナーゼ、アラキドン酸リポキシゲナーゼ、アロマトラーゼ、サイクロオキシゲナーゼ、DNAリガーゼI、エラスターゼ、プロテインキナーゼAとC、RNA依存性DNAポリメラーゼ等である。またUrsolic acidは抗炎症作用、肝機能保護、免疫調節作用、ガン細胞増殖抑制作用等多くの生理作用が知られているが、その作用機序は不明である。NTPaseの反応機構はこれらの生理作用に関与する酵素群の反応機構に比べて非常に単純である。Ursolic acidによるNTPaseの反応阻害機構を解明することは、Ursolic acidによる各種の生理作用機構の解明に役立つと考えられる。

5種類の化合物のうち最も虫体の増殖抑制効果

のあった化合物5(2-phenylthio indole)の各種関連化合物は、酵素活性の阻害効果の増大、虫体の増殖抑制の増大、また逆の作用等、化合物の構造変化による作用変化に対して有用な情報を提供した。しかし今後薬剤の候補としてなりうるほどの大きな変化をもたらす作用は観察されなかった。現在入手可能な化合物では強力な虫体増殖抑制作用は得られなかったが、今後関連化合物を更に検討することは、強力な虫体増殖抑制作用のある化合物が見つかる可能性があると考えられる。

トキソプラズマのNTPaseはGDA1/CD39(Pfam 01150)に属するアピラーゼ活性を持つE-型ATPaseである。このグループに属する他の酵素はN-末端付近にATPの結合部位があり、ベータホスフェートの結合に重要であると考えられている。しかし現在、これらの酵素の構造に関しては何も知られておらず、今回のNTPaseの阻害剤に関する知見は、このグループの酵素の反応機構の解析に非常に有用な情報となるだろう。

NTPaseは虫体に特異的に存在し、しかも虫体の増殖にとって必須であることから、抗トキソプラズマ剤の標的として非常に適している。酵素活性の阻害が虫体の増殖抑制に直接関与することが今回示唆されたが、NTPaseのRNAに対するアンチセンスDNAが虫体の増殖を抑制する事実⁵⁾からも、NTPaseが虫体の増殖に重要な酵素であることがわかる。いずれにしろ宿主細胞に対する毒性が低く、NTPase活性を強力に阻害する化合物を見出すことは、有効性の高い抗トキソプラズマ剤の開発につながるだろう。

結 論

トキソプラズマに特異的に存在するNTPaseのアイソザイム、NTPase-I及びNTPase-IIの阻害剤を検索した。これら化合物はトキソプラズマ虫体の増殖抑制作用があり、今後有効性の高い治療薬の開発が期待される。

健康危険情報

なし。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito T., Maeda T., Nakazawa M., Takeuchi T., Nozaki T., Asai T.: Characterization of hexokinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoite. International Journal for Parasitology (in press).

2. 学会発表

- 1) Asai T., Miura S., Nakazawa M., Saito T., Maeda T., Takeuchi T., Sibley L.D.: Analysis of substrate specificities of *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase isoforms. 6th International Congress on Toxoplasmosis, 21-25 May, 2001
- 2) Maeda T., Saito T., Nakazawa M., Takeuchi T., Ajio-ka J.W., Asai T.: Characterization of the gene encoding pyruvate kinase, glycolytic enzyme from *Toxoplasma gondii*. 6th International Congress on Toxoplasmosis, 21-25 May, 2001
- 3) Saito T., Maeda T., Nakazawa M., Takeuchi T., Ajio-ka J.W., Asai T.: Molecular cloning and characterization of hexokinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoite. 6th International Congress on Toxoplasmosis, 21-25 May, 2001

参考文献

- 1) Asai, T., W. J. O'Sullivan, and M. Tatibana 1983. A potent nucleoside: triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* J. Biol. Chem. 258:6816-6822.
- 2) Asai, T., S. Miura, L. D. Sibley, H. Okabayashi, and T. Takeuchi 1995.: Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii* J. Biol. Chem. 270:11391-11397.
- 3) Asai, T., D. K. Howe, K. Nakajima, T. Nozaki, T. Takeuchi, and L. D. Sibley 1998. *Neospora caninum*: Tachyzoites express a potent Type-I nucleoside triphosphate hydrolase, but lack nucleoside diphosphate hydrolase activity Exp. Parasitol. 90:277-285.
- 4) Nakaar, V., B. U. Samuel, E. O. Ngo, and K. A. Joiner 1999. Targeted reduction of nucleoside triphosphate hydrolase by antisense RNA inhibits *Toxoplasma gondii* proliferation J. Biol. Chem. 274:5083-8087.

知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし



トキソプラズマの糖代謝経路の解析： ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 遺伝子のクローニング

野崎 智義¹⁾、浅井 隆志²⁾、仙道富士郎³⁾

¹⁾ 国立感染症研究所、寄生動物部

²⁾ 慶應義塾大学医学部、熱帯医学寄生虫学教室

³⁾ 山形大学

研究要旨

エイズ患者に高率に発症するトキソプラズマ脳炎の原因原虫であるトキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) のエネルギー産生系は、糖代謝に依存していることが明らかであるが、その調節機構に関する包括的な研究がなされてこなかった。新規薬剤を開発するにあたりエネルギー産生系は重要な標的のひとつである。我々は糖代謝経路のいくつかの重要な酵素の遺伝子をクローニングし、遺伝子組み換え酵素の性質を調べてきた。その結果、宿主の糖代謝は異なる調節機構の存在が明らかになりつつある。今回は包括的研究の一部であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) 遺伝子のクローニングについて報告する。塩基配列には 2032 bp のオープンリーディングフレーム (ORF) を含み、分子量 75339 Da、等電点 8.05 のタンパク質をコードしていることを確認した。そのタンパク質のアミノ酸配列は、すでに明らかとなっている他の生物の ATP 依存性 PEPCK と高い相同性を示したが、N-末端に 100 アミノ酸ほどのユニークな配列があり、その活性の調節に特異性があることが考えられる。

分担研究者：仙道富士郎

研究協力者：野崎智義、浅井隆志

Analysis of glycolytic pathway of *Toxoplasma gondii*: Cloning of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene

Tomoyoshi Nozaki¹⁾, Takashi Asai²⁾, Fujiro Sendo³⁾

¹⁾Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, ²⁾Department of Tropical Medicine and parasitology, School of Medicine, Keio University and ³⁾Yamagata University

研究目的

近年、エイズ患者および臓器移植患者のような免疫抑制状態におけるトキソプラズマ脳症が増加している。とりわけエイズ患者の主たる死因の一つとして問題となっており、有効な薬剤の開発が待ち望まれてきた。細胞内寄生原虫トキソプラズマは、生活上、多様な生活環境に曝露され、その環境に応じて形態も変化する。よって他の生物に見られない特異的な代謝経路や代謝調節が存在することが予想され、この宿主と異なる代謝系の「特異性」は薬剤開発の有用な標的となりうるものである。トキソプラズマは糖代謝系を主要なエネルギー源とする。糖代謝系については多くの生物で詳しく研究がなされてきた。しかしながら、トキソプラズマについては、宿主細胞無しには培養が不可能であったために、宿主細胞由来タンパクの混入無しにトキソプラズマ由来酵素を精製することが困難であり、包括的な研究がなされてこなかった。

トキソプラズマは、中間宿主の哺乳類体内においては、非常に増殖が早いステージ(タキゾイト; 急増虫体)と遅いステージ(ブラディオイト; 緩増虫体)の存在が知られている。このブラディオイトからタキゾイトへのステージ転換が、トキソプラズマ脳症の発症過程として注目されている。この現象と関連したステージによる糖代謝系の変化が、近年知られるようになってきた。最大の違いは、タキゾイトはクエン酸サイクルおよび発酵系を共に用いるが、ブラディオイトはクエン酸サイクルを利用せず、発酵系を主に利用していることである^{1,2)}。また、糖貯蔵体であるアミロペクチンがブラディオイトのみで大量に産生されている。タキゾイトからブラディオイトへの転換の際には、シストを形成し宿主内で潜伏するための貯蔵エネルギー源としてアミロペクチンが産生され、タキゾイトへの変換の際にはこれをエネルギー源として急速に増殖していると考えられている。すなわち、主たるエネルギー源とする解糖系と、アミロペクチン合成系の一経路と考えられる糖新生系の相反する流れが、ステージ変換の際に、何らかの調節を受けていると予想されている。以上のような考えからこの糖代謝系に着目した。そし

て、我々はすでにタキゾイトcDNAライブラリーより、ヘキソキナーゼおよびピルビン酸キナーゼをクローニングし、遺伝子組み換えタンパク酵素を作製し、その宿主と異なる調節機構を明らかにしてきた。

解糖系の中の不可逆的反応において、逆反応を行う迂回路は調節系として重要である。不可逆的な酵素の一つであるピルビン酸キナーゼの逆反応の迂回路となるのが、ピルビン酸をオキサロ酢酸に変えるピルビン酸カルボキシラーゼと、オキサロ酢酸をホスホエノールピルビン酸に変えるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)である。すなわち、ピルビン酸からの糖新生系に欠かせない酵素である。また、PEPCKは、糖原性アミノ酸からオキサロ酢酸を経て糖へ至る糖新生系への入り口となる反応を担う酵素でもありアミロペクチン産生における役割の解明において必要不可欠である。

今回我々は、トキソプラズマのタキゾイトcDNAライブラリーよりPEPCKをコードする遺伝子のクローニングを行い、そのアミノ酸配列を得てタンパク質の機能解析を行った。

研究方法

1. 試料

cDNAライブラリーはESTデータベースに使われているものと同様のライブラリーである。IZAP-IIファージに入ったトキソプラズマ(RHstrain)タキゾイトcDNAライブラリーはDr. J. Ajioka(ケンブリッジ大学、イギリス)から提供されたものを用いた。

2. トキソプラズマPEPCK遺伝子のクローニング

トキソプラズマ(RHstrain)タキゾイトのESTデータベースよりホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼをコードするEST(IDナンバー: BG658521)から、次のPCRプライマーを設計した。

5'-TGTCCGTCCTCTCTTGCAG-3' (センス)(MN1)

5'-GTTTGTGGTGTTCAGGTTTC-3' (アンチセンス)(MN2)

このプライマーを用いてプローブを作製しライブラリーをスクリーニングした。DIG High Prime DNA ラベリング法を用いてプローブの標識を行った。約15万のブランクから4個の陽性ブラー

クが得られ、2次、3次スクリーニングを行い、最も長いインサートの入ったプラークを選択した。このクローンをプラスミド、pBSIIsk(-)、に変換してその塩基配列をダイターミネーション法で、オートシーケンサー、ABI 310(ABIprism)を用いて決定した。

3. 解析

得られたDNA配列から推定されるPEPCKは全長のアミノ酸配列が得られ、これをVector NTIsuite 7(Informax)を用いて、分子量、等電点など基本的性質を解析した。また、このPEPCKと同一性の高いタンパク質をBLASTを用いて検索した。そして、他の生物で推定されたPEPCKにおける機能ドメインのアミノ酸配列に相同配列があるか比較した。

(倫理面への配慮)

該当せず。

研究結果

5種類のプラークより、エクシジョンによりサブクローニングしたpBSII sk(-)の環状DNAを、制限酵素(Not I)で切断して電気泳動を行なった(図1)。その結果最も長いインサートを含むDNAの全

長は約6000bpであった。シークエンシングにより得られたこのクローンのcDNAの全長は2768bpだった。これはPEPCKをコードしていると予想される2032 bpのオープンリーディングフレーム(ORF)を含み、その5'非翻訳領域は209 bp、3'非翻訳領域は529 bpであった。このORFのコードするタンパク質は、計算により分子量75339 Da、等電点8.05と推測された。

PBLASTサーチによると、*Plasmodium falciparum* PEPCKがトキソプラズマのPEPCKと予測されるタンパク質に対して最も高いスコアを示した。ほかに *Emericella nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*のATP依存性PEPCKが60%以上の高い相同性を示した。一方宿主となるヒトを含めた哺乳類のGTP依存性PEPCKとの相同性は低かった。結晶解析がすでに行われている *E. coli*, *Trypanosoma cruzi*, および *P. falciparum*, *A. thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*のPEPCKとアライメント解析を行った結果を示した(図2)。ATP依存性PEPCK、GTP依存性PEPCK共に保存されているPEPCK特異的ドメイン、および、ATP依存性PEPCK共通に保存されているKinase-1a, Kinase2配列、そしてアデニン結合部位と、ATP依存性PEPCKに共通に保存されている4つのドメイン³⁾がすべて保存されていた。これらのことから、今回得られたクローンはATP依存性

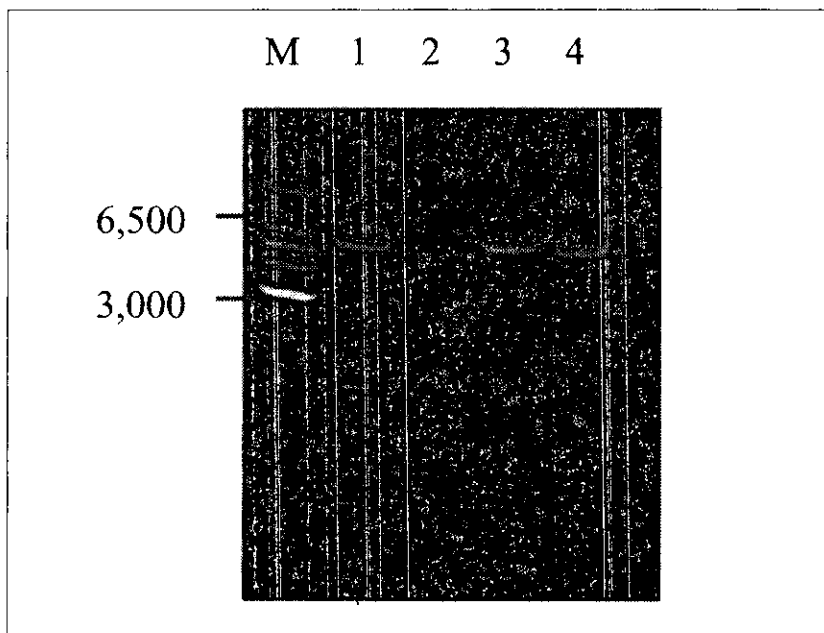


図1. 四つのcDNAクローンのアガロースゲル電気泳動像
M: マーカー、1-4: 5500bp-6000bp クローン

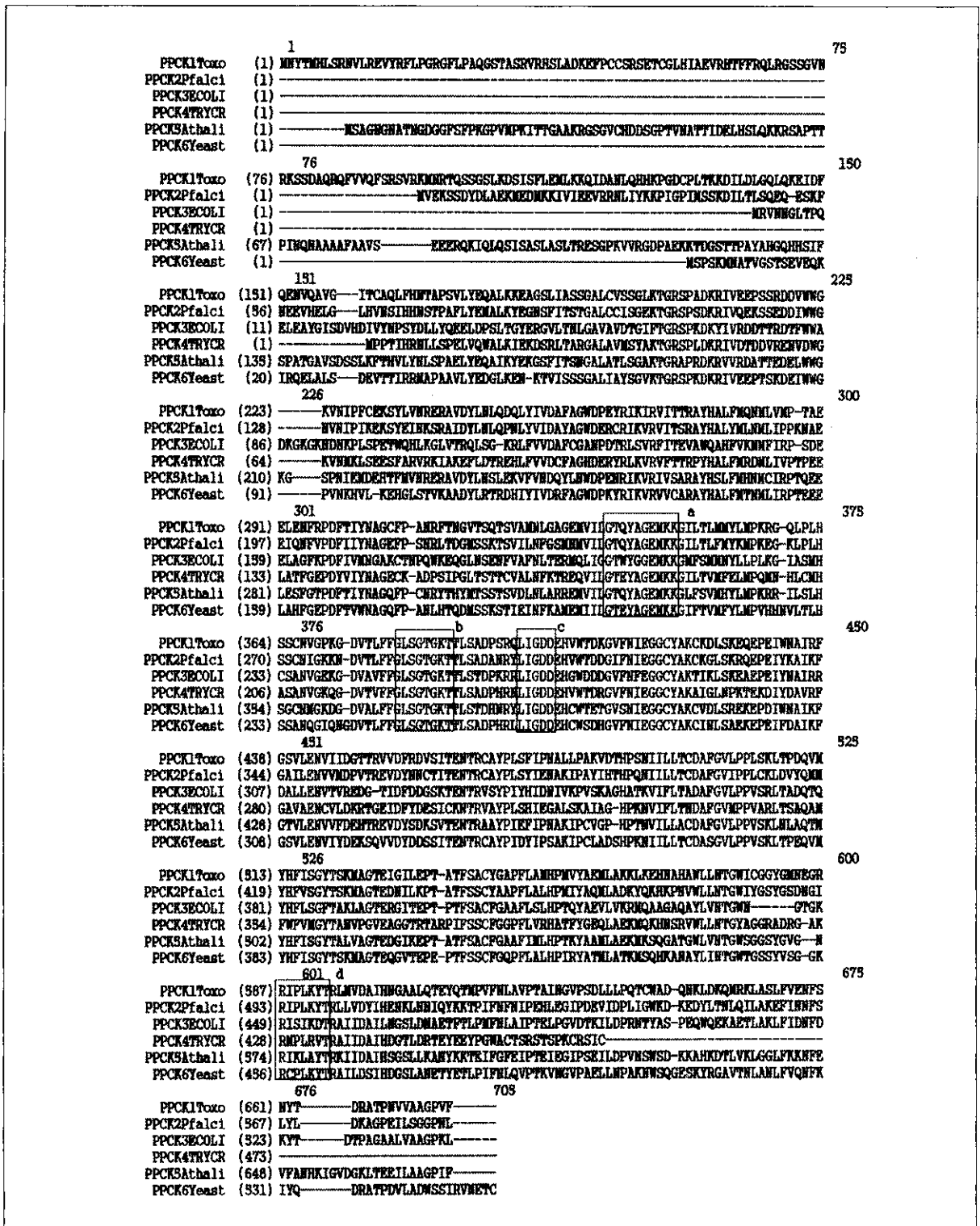


図2. 他の生物種のATP-dependent PEPCKとトキソプラズマ PEPCKのアライメント結果。

- PPCK1TOXO: *Toxoplasma gondii*
- PPCK2Pfalci: *Plasmodium falciparum*,
- PPCK3ECOLI: *Escherichia coli*,
- PPCK4TRYCR: *Trypanosoma cruzi*,
- PPCK5Athali: *Arabidopsis thaliana*,
- PPCK6Yeast: *Saccharomyces cerevisiae*
- a: PEPCK 特異的ドメイン
- b: Kinase 1-a (Phosphoryl-binding sequence)
- c: Kinase-2
- d: アデニン結合部位