

12、IL-18といったサイトカインを産生することにより免疫賦活化作用を示す<sup>14,18)</sup>。特に、IL-12はTh1反応を誘導する上で最も重要なサイトカインであるが、CpG-ODNはCD40への接着とともに樹状細胞に作用してIL-12の産生を増加させる<sup>17)</sup>。

これまでCpG-ODNによる*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*や*Leishmania major*に対する防御効果は報告されているが<sup>19-21)</sup>、クリプトコノカスについてはいまだ明らかになっておらず、本報告によりその効果が明らかにされた。この結果からCpG-ODNを用いた新たな免疫療法がエイズに合併した難治性クリプトコノカス感染症患者において有用である可能性が推察された。そこでCD4+T細胞を抗CD4抗体で除去したマウスを用いてCpG-ODNの効果を検討した。さらには、HIV感染者および非感染者の末梢血単核球のCpG-ODN刺激によるIL-12産生能を調べた。この2つの実験結果では、免疫不全の状態ではCpG-ODNの効果も減弱しており、CpG-ODNが治療的に作用しうるかは今後のさらなる解析が必要であると思われる。

これまでの報告ではチオール化していないCpGモチーフを含む合成DNAの治療では重篤な副作用は認めていない<sup>22)</sup>。また、動物実験を重ねる中でチオール化したCpG-ODNによる副作用は観察されておらず、新たな免疫療法として比較的安全に使用できる可能性が期待される。今後ともエイズ患者におけるCpG-ODN投与の治療的有用性について解析を進めていきたい。

## 参考文献

- 1) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka Y, Sudo T Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG I isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity J Natl Cancer Inst 72 955-62, 1984
- 2) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation Nature 374 6546-49, 1995
- 3) Arthur M, Krieg AM, Hermann W Causing a commotion in the blood immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA Immunol Today 21 521-26, 2000
- 4) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S A toll-like receptor recognizes bacterial DNA Nature 408 740-45, 2000
- 5) Agrawal S, Kandimalla ER Medicinal chemistry and therapeutic potential of CpG DNA Trends Mol Med 8 114-21, 2002
- 6) Lim TS, Murphy JW Transfer of immunity to cryptosporidiosis by T-enriched splenic lymphocytes from *Cryptococcus neoformans* sensitized mice Infect Immun 30 5-11, 1980
- 7) Kawakami K, Tohyama M, Teruya K, Kudaken N, Xie Q, Saito A Contribution of interferon-gamma in protecting mice during pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* FEMS Immunol Med Microbiol 13 123-30, 1996
- 8) Kawakami K, Tohyama M, Xie Q, Saito A IL-12 protects mice against pulmonary and disseminated infection caused by *Cryptococcus neoformans* Clin Exp Immunol 104 208-14, 1996
- 9) Kawakami K, Qureshi MH, Zhang T, Okamura H, Kurimoto M, Saito A IL-18 protects mice against pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* by inducing IFN- $\gamma$  production J Immunol 159 5528-5534, 1997
- 10) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Miyazato A, Yara S, Kinjyo Y, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Kurimoto M, Saito A IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN- $\gamma$  production by NK cells J Immunol 165 941-7, 2000
- 11) Kawakami K Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens J Immunother 25 S12-9, 2002
- 12) Papas PG, Bustamante B, Ticano E Adjunctive interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) for treatment of cryptococcal meningitis arandomized, double-blind pilot trial 41st annual ICAAC Conference, Abstract #41239, 2001
- 13) Kawakami K, Kinjyo Y, Yara S, Koguchi Y, Uezu K, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A Activation of Va14 + natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans* Infect Immun 69 213-20, 2001
- 14) Krieg AM CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects Annu Rev Immunol 20 709-60, 2002
- 15) Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM CpG DNA apotential signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells Proc Acad Sci USA 96 9305-10, 1999
- 16) Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ Distinct CpG DNA and polyinosinicpolycytidylic acid double stranded RNA respectively, stimulate CD11C(-) type 2 dendritic cells to produce type IFN J Immunol

- 166 2291-5, 2001
- 17) Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12 *Eur J Immunol* 31 3026-37, 2001
  - 18) Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, deWaal MR, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ Subsets of human dendritic cells precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens *J Exp Med* 194 863-70, 2001
  - 19) Elkuns KL, Rhinehart-Jones TR, Stubit S, Conover JS, Klinman DM Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria *J Immunol* 162 2291-8, 1999
  - 20) Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, Harty JT CpG DNA induces sustained IL-12 expression *in vivo* and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge *J Immunol* 161 2428-34, 1998
  - 21) Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis *J Immunol* 160 3627-30, 1998
  - 22) Krieg AM Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy *J Gene Med* 1 56-63, 1999
  - 5) Koguchi Y, Kawakami K Cryptococcal infection and Th1-Th2 cytokine balance *Int Rev Immunol* 21 423-38, 2002
  - 6) Kawakami K, Koguchi Y, Qureshi MH, Zhang T, Kinjo Y, Yara S, Uezu K, Shibuya K, Naoe S and Saito A Anti-CD11b monoclonal antibody suppresses brain dissemination of *Cryptococcus neoformans* in mice *Microbiol Immunol* 46 181-186, 2002
  - 7) Kinjo Y, Kawakami K, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Hoshino T, Okamoto M, Kawase Y, Yokota K, Yoshino K, Takeda K, Akira S, Saito A Contribution of IL-18 to Th1 response and host defense against infection by *Mycobacterium tuberculosis* A comparative study with IL-12p40 *J Immunol* 169 323-9, 2002
  - 8) Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K, Yara S, Miyagi K, Koguchi Y, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A Minimal contribution of Va14 natural killer T cells to Th1 response and host resistance against mycobacterial infection in mice *Microbiol Immunol* 46 207-10, 2002
  - 9) Koguchi Y, Kawakami K, Kon S, Segawa T, Maeda M, Uede T, Saito A *Penicillium marneffei* causes osteopontin-mediated production of interleukin-12 by peripheral blood mononuclear cells *Infect Immun* 70 1042-8, 2002

## 2 学会発表

- 1) 宮城一也, 川上和義, 金城雄樹, 上江洲香織, 屋良さとみ, 高口善信, 齋藤 厚 結核感染防御とIL-18 トランスジェニックマウスを用いた解析 第77回日本結核病学会総会, 東京, 4月2002
- 2) 上江洲香織, 川上和義, 金城雄樹, 屋良さとみ, 宮城一也, 高口善信, 齋藤 厚 結核感染防御とIL-18 IL-12/IL-23との比較検討 第77回日本結核病学会総会, 東京, 4月2002
- 3) 川上和義 結核感染とTH1応答 基礎実験成績から臨床への展開 シンポジウム, 第77回日本結核病学会総会, 東京, 4月2002
- 4) 金城雄樹, 川上和義, 上江洲香織, 屋良さとみ, 宮城一也, 高口善信, 齋藤 厚 クリプトコッカス感染防御におけるNKT細胞の役割 NK細胞との比較検討 第76回日本感染症学会総会, 東京, 4月2002
- 5) 上江洲香織, 川上和義, 金城雄樹, 宮城一也, 高口善信, 齋藤 厚 クリプトコッカス感染によるgdT細胞の肺内集積とその防御免疫における役割 第76回日本感染症学会総会, 東京, 4月2002
- 6) 高口善信, 川上和義, 健山正男, 新里 敬, 比嘉大, 仲本 敦 大高勤子, 久場睦夫, 中田 尤, 齋藤 厚 ヒト結核感染防御におけるオステオポ

## 健康危険情報

特になし

## 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Koguchi Y, Kawakami K, Uezu K, Fukushima K, Kon S, Maeda M, Nakamoto A, Owan I, Kuba I, Kudeken N, Yara S, Shinzato T, Higa F, Tateyama M, Kadota J, Mukae H, Kohno S, Uede T, Saito A High plasma osteopontin level and its relationship with IL-12-mediated Th1 response in tuberculosis *Am J Respir Crit Care Med* in press, 2003
- 2) Kawakami K Role of natural killer T cells in host defence against cryptococcal infection *Revista Iberoamericana de Micologia* 19 149-54, 2002
- 3) 川上和義 クリプトコッカス感染防御とNKT細胞 - 自然免疫から獲得免疫へ - 日本医真菌学会雑誌 43 137-41, 2002
- 4) Kawakami K Interleukin-18 and host defense against infectious diseases *J Immunother* 25 S12-

- ンチンの役割 第76回日本感染症学会総会, 東京, 4月2002
- 7) Kinjo Y, Kawakami K, Yamamoto N, Miyagi K, Kinjo T, Uezu K, Nakasone C, Nakayama T, Tanguchi M, Saito A The role for Va14+ NKT cells in the early host defense against pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae* The second International Workshop on CD1 antigen presentation and NKT cells Boston, November 2002
  - 8) Kawakami K Contrasting roles of natural killer T and antigen receptor gd-bearing T cells in the host immune response against cryptococcal infection Symposium, The second International Workshop on CD1 antigen presentation and NKT cells Boston, November 2002
  - 9) 金城武士, 川上和義, 上江州香織, 金城雄樹, 宮城一也, 齋藤 厚 クリプトコッカスによる宿主免疫反応の制御機構 NKT細胞活性化の抑制 第32回日本免疫学会総会, 東京, 12月2002 1) Kinjo Y, Kawakami K, Yara S, Uezu K, Koguchi Y, Nakayama T, Tanguchi M, Saito A V $\alpha$ 14+NKT cells play an important role in the host defense to *Cryptococcus neoformans* infection through inducing Th1 response Scand J Immunol 54S1 83, 2001

#### 知的財産権の出願・登録状況

特になし



## 初診時CD4陽性リンパ球数100個/ $\mu$ l未満の患者におけるカリニ肺炎早期診断のための臨床研究

味澤 篤<sup>1)</sup>、今村 顕史<sup>1)</sup>、菅沼 明彦<sup>1)</sup>、根岸 昌功<sup>1)</sup>、大林 民典<sup>2)</sup>、鎌田 憲子<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 東京都立駒込病院感染症科

<sup>2)</sup> 同臨床検査科

<sup>3)</sup> 同放射線科

### 研究要旨

免疫不全状態のHIV感染者はニューモシスチス カリニ肺炎(PCP)を発症する頻度が高い。また胸部X線写真上、異常所見が認められずPCPの診断治療が遅れる場合もあり、CD4低値HIV感染者におけるPCP早期診断のためにどのような検査を行うべきかの検討が必要である。そこで2002年2月以降に当院初診あるいは長期間受診せず、CD4陽性リンパ球数が100個/ $\mu$ l未満と判明し、胸部X線写真上、異常所見のみられないHIV感染者に以下の検査を迅速に行なった。(1)血液KL-6、SP-Dおよび $\beta$ 1-3-Dグルカン測定、(2)胸部単純HR-CT、(3)喀痰カリニPCR。上記の条件を満たした症例は10例みられたが、これらの症例では明かなPCPは認められず、その後の経過観察中にPCPを発病した例もみられなかった。しかし血液検査では、KL-6は4例、SP-D 2例および $\beta$ 13Dグルカン 2例で、軽～中等度の増加を認めた。胸部HR-CTでは、1例に右下肺主体に網状影および一部線状影やスリカラス陰影を認め、他1例に右肺下葉に2×2.5cmの結節陰影を認めた。喀痰カリニPCRは検体提出可能であった4例中2例に陽性所見が認められたが、胸部HR-CTでは所見無くいずれもカリニ肺炎の予防とHAARTのみで経過良好であった。CD4+低値HIV感染者での胸部HR-CT検査はPCP早期診断の可能性を高め、他合併症の早期診断にも有用である。

分担研究者 味澤 篤

研究協力者 今村顕史、菅沼明彦、根岸昌功、大林民典、鎌田憲子

**Clinical approach to early diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the HIV-positive patients whose CD4 positive lymphocytes are less than 100 cells /  $\mu$  l**

Atsushi Ajsawa<sup>1)</sup>, Akifumi Imamura<sup>1)</sup>, Akihiko Suganuma<sup>1)</sup>, Masayoshi Negishi<sup>1)</sup>, Taminori Oobayashi<sup>2)</sup> and Noriko Kamata<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Infectious Diseases Tokyo Metropolitan Komagome Hospital, <sup>2)</sup> Department of Clinical Laboratory Tokyo Metropolitan Komagome Hospital and <sup>3)</sup> Department of Radiology Tokyo Metropolitan Komagome Hospital

## 研究目的

免疫不全状態の HIV 感染者はニューモシスチス カリニ肺炎 (PCP) を発症する頻度が高い。平成13年当院初診の HIV 感染者130名中、CD4陽性リンパ球数 (CD4+) が100個/ $\mu$ l未滿の患者は32名であった。32名中16人50%がカリニ肺炎 (PCP) を発病した。さらに16人中4人はCD4数判明時の胸部X線写真上、異常所見が認められずPCPの診断治療が遅れた。CD4+ 低値 HIV 感染者におけるPCP早期診断のためにどのような検査を行うべきかの検討を行なった。

## 研究方法

2002年2月以降に当院初診あるいは長期間受診せず、CD4陽性リンパ球数が100個/ $\mu$ l未滿と判明し、胸部X線写真上、異常所見のみられない HIV 感染者に以下の検査を迅速に行なった。

- (1) 血液KL-6、SP-Dおよび $\beta$ 1-3-Dグルカン測定
- (2) 胸部単純HR-CT
- (3) 喀痰カリニ PCR

## 研究結果

上記の条件を満たした症例は10例みられた。男性7例、女性3例で、年齢は26～64歳(平均45.2歳)にわたっていた。感染経路としては異性間によるものが7例で、同性間によるものが3例であった。検査施行時のCD4+は2～83個/ $\mu$ l(平均31個)であり、HIV-RNAは41,000～3,600,000 copies/ml(平均606,200)であった。

### 1 血液LDH、KL-6、SP-Dおよび $\beta$ Dグルカン値一表1

KL-6高値例(500U/ml以上)が4例、SP-D高値例(110ng/ml以上)が2例、 $\beta$ Dグルカン高値例が2例(共に食道カンジダ症を合併)認められた。

### 2 胸部HR-CT所見とカリニ原虫検査一表2

4例に異常陰影を認めたが特に症例7および8に明らかな異常陰影を認めた。喀痰カリニPCRが施行できた4例中2例、症例3および5にカリニ原虫

陽性所見が認められた。

### 3. 症例7一図1、図2

60代女性。2002年4月頃より口腔内に白苔。8月13日近医入院し上部内視鏡にて食道カンジダ症カ指摘されFCZ400mgで改善した。8月20日WB(+)、HIV-RNA 110,000 copies/ml、CD4 10.2%(78個/ $\mu$ l)にて紹介された。外来胸部CTにて、右下肺にreticular densities、一部linear densitiesやground-glass appearanceがみられた。KL-6、SP-Dの増加を認め、気管支肺胞洗浄液(BAL)-カリニPCR陽性であったが、BALグロコト染色は陰性でGaシンチグラフィでは明らかな集積はなかった。ST合剤による予防とHighly active antiretroviral therapy (HAART)のみで経過良好。

### 4 症例8一図3、図4

2002年8月中旬より右視力障害のため、近医受診しCMV網膜炎、HIV感染症と診断され当院紹介入院となった。9月19日よりganciclovir開始した。血清クリプトコカス抗原は陰性であった。Ganciclovirにて白血球減少を認めるもCMV網膜炎は改善した。右肺の結節陰影に対し気管支鏡施行するも原因不明。10月15日よりd4T+3TC+LPV/r開始、特に結節陰影の悪化なく退院。2003年1月7日の胸部CTで改善傾向。

### 5. 症例3一図5

2002年2月より体重減少(8kg/3ヶ月)を認め、近医受診し悪性リンパ腫と診断された。HIV抗体陽性にて当院紹介入院となった。入院時喀痰カリニPCR(+)もCTおよびGaシンチ上の所見無し。4月22日よりST合剤によるPCP予防開始、26日よりCAM、d4T+3TC+NfV開始。5月8日より悪性リンパ腫に対しEPOCH療法を開始した。9月10日まで6クール施行し退院した。経過中PCPのエピソードはみられなかった。

表1 血液LDH KL-6、SP-DおよびβDグルカン値

症例	LDH	KL-6	SP-D	βDグルカン
1	595	378	-	7.76
2	186	297	-	18.2
3	174	520	40.5	17.11
4	161	249	17.3	8.84
5	190	673	85	41.88
6	214	352	120.4	-
7	293	689	197.6	114.52
8	389	519	61.9	4.72
9	109	168	17.3	7.23
10	214	218	42.5	10.9

表2 胸部HR-CT所見とカリニ原虫検査

症例	胸部CT所見	カリニ原虫
1	所見なし	未検
2	所見なし	喀痰加PCR(-)。
3	両側上肺野末梢に2cmまでのプラ	喀痰加PCR(+)
4	軽度気管支壁肥厚	未検
5	所見なし	喀痰加PCR(+)
6	所見なし	未検
7	右下肺主体に網状影、一部線状影やスリガラス陰影もある	BAL(-)。BALPCR(+)
8	右肺下葉に2x2.5cmほどの結節	BAL(-)
9	所見なし	未検
10	両側肺尖部右優位に囊胞形成、右S2やS6の末梢に網状のdensity(古い炎症性の変化)	喀痰加PCR(-)

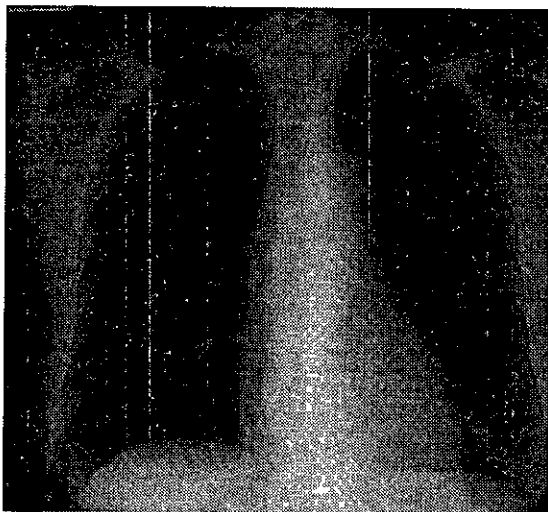


図1 症例7の胸部単純X線

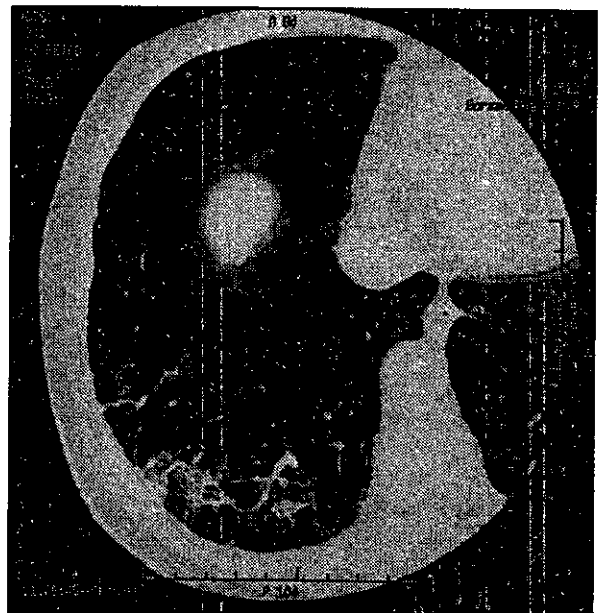


図2 症例7の胸部HR-CT, 右下肺主体に網状影 一部線状影やスリガラス陰影も認める

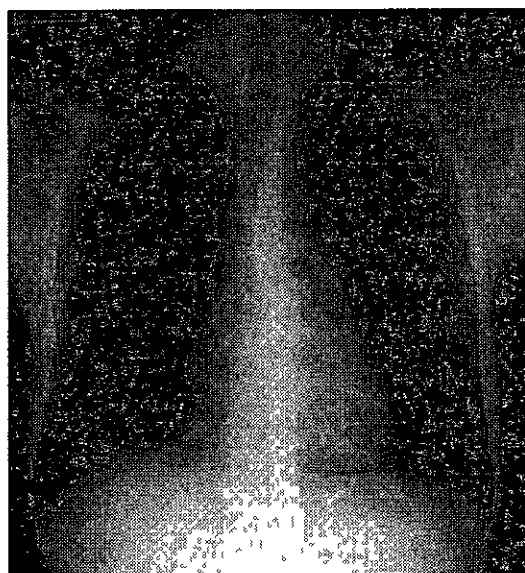


図3 症例8の胸部単純X線写真

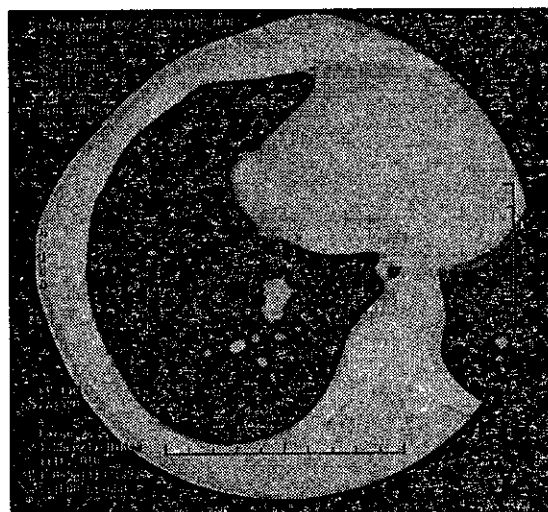


図4 症例8の胸部HR-CT, 右肺下葉に2x2.5cm程の結節性陰影を認める。石灰化は無く、変縁は比較的smoothであるがわずかにspiculationを認める。

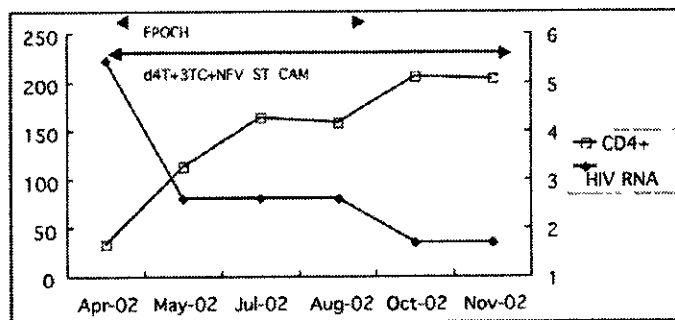


図5 症例3の経過表

## 考 察

CD4+ が低値の HIV 感染者に最も高頻度にみられる日和見感染症はカリニ肺炎である。当院 AIDS 合併カリニ肺炎の発症時 CD4+ を検討した結果でも、173 例中 130 例が 49 個/μl 未満で、22 例は 50 から 99 個/μl で発病していた。またカリニ肺炎の初期には、胸部単純 X 線で異常陰影を認めないあるいは非常に軽度であることもしばしば経験する。そこで今回 prospective study を試みたが明らかな PCP の症例を経験することはできなかった。しかし症例 7 は KL-6 および SP-D も増加し、胸部 HR-CT 上も極めて疑わしい症例であった。ただし Ga 集積は有意ではなく気管支洗浄液も PCR のみ陽性で、PCP の治療することも無く経過しており、確定診断はできなかった。今後も CT で経過を追う予定である。症例 8 は画像的には、PCP は考えにくかったが他の日和見感染症も疑われる重要な所見であった。CD4+ 低値 HIV 感染者における胸部 HR-CT の必要性を強く示唆する症例と思われる。

喀痰カリニ陽性例 2 例は、軽度の KL-6 の増加を伴っており、さらに放置されていれば PCP を発病した可能性はある。しかし両者ともカリニ肺炎の予防と HAART のみで経過を見たか PCP の発病はみられなかった。少なくとも喀痰カリニ PCR が陽性のみで胸部 HR-CT 所見が無ければ PCP として治療する必要はないのかもしれない。

## 結 論

- (1) 2002 年 2 月以降に当院初診あるいは長期間受診せず、CD4 陽性リンパ球数が 100 未満と判明し、胸部 X 線写真上異常所見のみられない HIV 感染症例は 10 例みられたか、これらの症例では明かな PCP は認められず、その後の経過観察中に PCP を発病した例もみられなかった。
- (2) しかし血液検査では、KL-6 は 4 例、SP-D および β13D グルカンは各 2 例で、軽～中等度の増加を認めた。
- (3) 胸部 HR-CT では、1 例に右下肺野に網状影および一部線状影やスリガラス陰影を認め、他 1 例に右肺下葉に 2 × 2.5 cm の結節陰影を認めた。

- (4) 喀痰カリニ PCR は検体提出可能であった 4 例中 2 例に陽性所見が認められたが、胸部 HR-CT では所見無くいずれもカリニ肺炎の予防と HAART のみで経過良好であった。
- (5) CD4+ 低値 HIV 感染者での胸部 HR-CT 検査は PCP 早期診断の可能性を高め、他合併症の早期診断にも有用である。

## 健康危険情報

なし

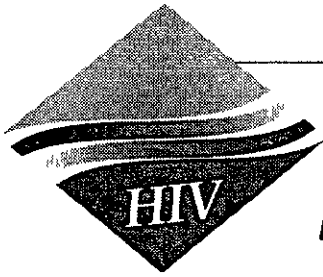
## 研究発表

- 1) 今村顕史、菅沼明彦、味澤 篤、根岸昌功  
駒込病院におけるエイズ合併カリニ肺炎の臨床像および治療法の変遷についての検討 第 16 回日本エイズ学会総会、名古屋、2002 年

## 知的財産権の出願・登録状況

なし





## *Pneumocystis carinii* における薬剤標的酵素： dihydrofolate reductase の遺伝子多型に 関する研究

中村 哲也、高橋 孝、岩本 愛吉

東京大学医科学研究所附属病院感染免疫内科

### 研究要旨

Trimethoprimの標的酵素であるdihydrofolate reductase (DHFR)の遺伝子多型を検討し、サルファ剤の治療成績との関連性を解析した。34例のカリニ肺炎症例肺胞洗浄液から分離されたニューモシスチス カリニの34例中2例においてDHPS領域のアミノ酸の変異 ( $^{67}\text{Ala} \rightarrow \text{Val}$ ,  $^{166}\text{Cys} \rightarrow \text{Tyr}$ ) が認められた。その他、15例で $^{312}\text{T} \rightarrow \text{C}$ 、2例で $^{540}\text{T} \rightarrow \text{C}$ の塩基置換を認めたが、これらはアミノ酸変位を起こさなかった。アミノ酸変位を有したカリニ肺炎症例ではST合剤による治療が奏功しており、DHFRの遺伝子多型とtrimethoprimの治療効果の間には明らかな相関が見られなかった。

分担研究者 中村哲也

研究協力者 高橋 孝、岩本愛吉

**Gene polymorphism of an enzyme dihydrofolate reductase targeted by drugs in *Pneumocystis carinii* f sp hominis**

Tetsuya Nakamura, Takashi Tajahashi and Aikichi Iwamoto

*Division of Infectious Diseases & Applied Immunology, The Institute of Medical Science The University of Tokyo*

## 研究目的

ニューモンスチス カリニ (*P. carinii*) 肺炎は、HIV感染者に合併し生命予後を脅かす日和見感染症である。われわれは本研究班において *P. carinii* の分子生物学的解析を行い、その疫学や薬剤感受性の解析を行ってきた。平成13年度では、サルファ剤の標的酵素である Dihydropteroate Synthase (DHPS) 遺伝子の解析を行い、24例中6例(25.0%)において DHPS 領域のアミノ酸の変異 ( $^{55}\text{Thr} \rightarrow \text{Ala}$ ,  $^{57}\text{Pro} \rightarrow \text{Ser}$ ) を認め、これらの症例はアミノ酸変異を示さないカリニ群と比較して有意に ST 合剤の治療効果が低下していたことを示した。平成14年度では、Trimethoprim の標的酵素である Dihydrofolate Reductase (DHFR) に着目し、そのアミノ酸変異と薬剤感受性の間に連鎖がないかを検討した。

## 研究方法

34例のカリニ肺炎患者の気管支肺胞洗浄液より核酸を抽出し、PCR法を用いて *P. carinii* の DHFR 遺伝子全長を増幅した。塩基配列を決定し、ST合剤による治療効果との関連を検討した。

## 研究結果

34症例中1症例で  $^{200}\text{C} \rightarrow \text{T}$  塩基置換を、1症例で  $^{539}\text{G} \rightarrow \text{A}$  変異を見出した。この塩基変異は共にアミノ酸変異を起こすが(それぞれ  $^{67}\text{Ala} \rightarrow \text{Val}$ 、 $^{166}\text{Cys} \rightarrow \text{Tyr}$ )、2症例とも ST 合剤による治療によく反応しており、治療効果との連鎖は示唆されなかった。その他にも2カ所の塩基置換が認められたが ( $^{312}\text{T} \rightarrow \text{C}$  15症例、 $^{540}\text{T} \rightarrow \text{C}$  2症例)、これらはアミノ酸変異を生じなかった。

## 考察

文献的には、肺炎球菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌、熱帯熱マラリア原虫で Trimethoprim 耐性を誘導するアミノ酸置換が報告されているが、これらは今回われわれが見出した  $^{67}\text{Ala} \rightarrow \text{Val}$ 、 $^{166}\text{Cys} \rightarrow \text{Tyr}$  とは異なる部位であった。したがって、 $^{67}\text{Ala}$

$\rightarrow \text{Val}$ 、 $^{166}\text{Cys} \rightarrow \text{Tyr}$  は Trimethoprim の感受性に影響を与えていない可能性がある。サルファ剤の標的酵素である DHPS に関しては ST 合剤の治療効果と連鎖するアミノ酸変異が存在することから、ST 合剤の主要効果は Sulfamethoxazole にあり Trimethoprim の影響が弱い可能性も考えられた。

## 結論

- (1) 34例のカリニ肺炎のうち、2例において、DHFR 領域のアミノ酸の変異 ( $^{67}\text{Ala} \rightarrow \text{Val}$ 、 $^{166}\text{Cys} \rightarrow \text{Tyr}$ ) が認められた。
- (2) このアミノ酸変異を有するカリニ肺炎症例は、trimethoprim を含んだ治療に良く反応していた。
- (3) 以上の結果から、このアミノ酸変異は DHFR の trimethoprim 感受性に影響を与えないか、または ST 合剤の主要効果は sulfamethoxazole にあり trimethoprim の影響が弱い可能性が考えられた

## 健康危険情報

特記すべきことなし。

## 研究発表

### 1 論文発表

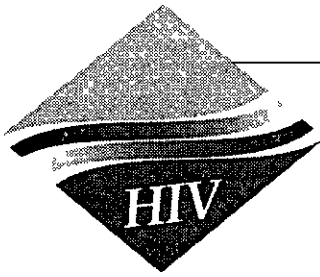
- 1) Takahashi, T, Endo, T, Nakamura, T, Sakashita, H, Kimura, K, Ohnishi, K, Kitamura, Y, and Iwamoto, A. Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis on Japan. *J Med Microbiol* 51: 510-515, 2002

### 2 学会発表

第13回日本エイズ学会

## 知的財産権の出願・登録状況

特に予定をしていない。



# 日和見原虫感染症の治療に関する研究 — *Entamoeba dispar* の確実な無菌培養法の確立と virulence の *in vitro* 解析

小林 正規<sup>1)</sup>、James A Dvorak<sup>2)</sup>、今井 栄子<sup>1)</sup>、Shaden Ali Khalifa<sup>1)</sup>、竹内 勤<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>慶應義塾大学医学部熱帯医学 寄生虫学教室

<sup>2)</sup>Laboratory of Malaria and Vector Biology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases,  
National Institute of Health, USA

## 研究要旨

*Entamoeba histolytica* と形態的に鑑別が困難であるが病原性を示さない *Entamoeba dispar* の無菌培養系の確立とその無菌培養株の virulence について *in vitro* の系で *E. histolytica* 分離株とともに比較検討した。既に独自に考案した YIGADHA-S 培地を用いオートクレーブ(121℃,15分)した細菌や部分精製したミトコンドリア、葉緑体、ヒドロゲノゾームや植物葉肉細胞アセトン抽出液上清に *E. dispar* の増殖活性があること、分離用電気泳動法により葉緑体の増殖促進物質が分子量約 3,500 ~ 6000 の葉緑素 蛋白複合体で、鉄、硫黄を含むことが昨年までの成果からわかっている。さらに精製されたハウレンソウや細菌(クロストリジウム)のフェレトキシンを還元剤処理後、可溶化した葉緑素と複合体としたもの、そして単純な構造を持つブレドキシンのような鉄-硫黄蛋白では還元剤処理するだけで増殖活性をもつことも新たに見いたした。そしてオートクレーブ処理したミトコンドリアをもつ原虫 *Crithidia fasciculata* を増殖促進物質として加え4年間にわたる培養期間を経て supplement を除いた無菌培養を試みた結果、培養を試みた5株全ての *E. dispar* の増殖が確認され、増殖数は適応能力に応じて大きく variation が見られるものの YIGADHA-S 培地成分のみで無菌培養が可能となった。これら無菌培養された *E. dispar* の virulence を判定するため、死細胞を特異的に染色する Ethidium homodimer 蛍光染色法(Dvorak,2000)を用い、virulence の高い *E. histolytica* が培養細胞と接触することで引き起こされる致死効果の *E. dispar* における有無をコンピューター制御倒立顕微鏡下でリアルタイムに観察した。本研究の成果は AIDS 患者とくに男性ホモセクシュアルの性癖を有す患者で高い感染率を示す *E. dispar* の株間の virulence の相違や免疫不全状態での virulence の検討に有用と考えられた。

分担研究者 竹内 勤

研究協力者 小林正規、James A Dvorak、今井栄子、Shaden Ali Khalifa

**Establishment of axenic culture system of *Entamoeba dispar*, and *in vitro* analysis of virulence of *Entamoeba* spp Isolates**

Seiki Kobayashi<sup>1)</sup>, James A Dvorak<sup>2)</sup>, Eiko Imai<sup>1)</sup>, Shaden Ali Khalifa<sup>1)</sup> and Tsutomu Takeuchi<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Tropical Medicine and Parasitology, School of Medicine Keio University and <sup>2)</sup> Laboratory of Malaria and Vector Biology National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health USA

## 研究目的

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*, Schaudinn, 1903) と形態的、遺伝子の相同性、免疫学的にも高い共通性を示す *Entamoeba dispar*, Brumpt, 1925 は組織侵入性が見られず、また実験的に直接肝組織内に接種しても膿瘍の形成が見られないことから非病原性のアメーバと考えられている。欧米の男性同性愛者由来の HIV 感染者ではその多くが *E. dispar* 感染であることが知られているが、他の先進諸国に対し我が国の男性同性愛者間には *E. histolytica* が高い頻度で見出されることも判っている。しかし最近、欧米の外国の男性同性愛者が日本で *E. histolytica* に感染する症例も増えてきている。そして、逆に日本人の男性同性愛者が *E. dispar* に感染する症例も見られるようになってきた。本研究は *E. histolytica* と *E. dispar* の生物学的性状の差異を明らかとし、その成果を薬剤開発に役立てること及び *E. dispar* の免疫不全時での virulence の解明に役立てようと計画した。この目的のために *E. dispar* の確実な無菌培養法の確立が必須であり、本研究においてその確立を先ず試みた。

## 研究方法

### 1 実験材料

#### 1) *E. dispar* (5株)

① SAW1734RcloneAR ② AS2IR ③ AS16IR ④ CYNO09 TPC ⑤ CYNO16 TPC の5株を使用した。CYNO09 TPC と CYNO16 TPC の2株は無菌的に YIGADHA-S 培地で、SAW1734RcloneAR、AS2IR、AS16IR の3株はオートクレーブ(121℃,15分)した *C. fasciculata* 或いはノユクサの葉肉細胞抽出液を増殖促進物質として加え無菌的に培養維持された。

#### *E. histolytica* (2株)

①HM-1 IMSScl6(ハムスターの肝臓に passage し virulence を高めた株) ②Rahman (長期間無菌培養することで実験動物への感染力と細胞障害性が失われた株)

#### Vertebrate 細胞株 (2株)

① HeLa cell ② Chinese Hamster Ovary (CHO) cell

### 2) 培地

#### *E. dispar* 用培地

我々が考案した YIGADHA-S 培地にガラクトノ酸 (0.02%) と 15% 成牛血清を加えた培地を用いた。

#### *E. histolytica* 用培地

15% 成牛血清加 BI-S-33 培地 (Diamond *et al.*, 1978) により培養した。

#### Vertebrate 細胞用培地

5%,10% 牛胎児血清加 Dulbecco's MEM (D-MEM) 培地を用い培養フラスコにて炭酸ガス孵卵器 (5%CO<sub>2</sub>,37℃) 内で培養し、顕微鏡観察実験には観察が容易な culture chamber (Lab-Tek, Cat No 155379, Nalge Nunc International) に細胞を播き 48 時間後にアメーバ栄養型と接触させた。

### 3) 細胞死判定

Ethidium homodimer (Cat No E-3599, Molecular Probes Inc, Eugene, OR) が死細胞だけを染色する性質を利用して顕微鏡下で細胞死を判定した。

コンピューター制御倒立顕微鏡システムは Leica DM IRE 2 倒立顕微鏡 [落射蛍光装置 Leica DC350F digital camera 付き] 及びイメージ解析は Image Pro version 4.5 (Media Cybernetic, Silver Spring, MD) ソフトを使用して行った。

## 2 方法

### 1) *E. dispar* 栄養型の無菌培養条件への適応度試験

オートクレーブ(121℃,15分)した *C. fasciculata* を加え継代培養している *E. dispar* 株から *C. fasciculata* を除き継代しその株の増殖数の変化を見ることで無菌培養条件への適応度を判定した。

### 2) *E. dispar* の無菌培養株の確立

無菌培養条件への適応力が確認された株は *C. fasciculata* を除いた培地で遠沈操作により培地交換を繰り返すことで継代しさらに適応能力の高いアメーバを選択することで無菌培養株の樹立を試みた。

### 3) *In vitro* 細胞毒性試験

アメーバ細胞が vertebrate 細胞に接触することでアポトーシスを誘導できることが報告されているか (Huston *et al.*, 2000)、その瞬間を顕微鏡により映像として捉えることはできなかった。Zieler and Dvorak (2000) はマラリアのオオキネートが vector

である蚊の中腸腺細胞へ侵入し、アホトーシスを引き起こす瞬間を ethidium homodimer 色素とビデオを用いることで初めて映像として捉えることに成功した。この手法を応用してDvorak との共同研究により *E histolytica* と *E dispar* の分離株の細胞毒性について検討した。

## 研究結果

### 1 *E dispar* の無菌培養株の確立

*E dispar* の増殖促進物質のひとつは細菌と細菌が起原と考えられているミトコントリア、ヒドロゲノゾームや葉緑体に局在し、オートクレーブ (121°C, 15分) することで安定した物質として得られること、また葉肉細胞 (葉緑体) から ultrasonic processor (GE 50, Sonics and Materials, Inc) による超音波処理 (4°C, 30分) やアセトン処理により葉緑素との複合体として水溶性成分に抽出されることが昨年までの実験結果から明らかとなっている。

しかしながらこの増殖促進物質がなくても増殖できる適応能力の高い *E dispar* 株が上記 supplement を加えた培地での長期の培養期間を経て出現してくることから、*E dispar* には本来この物質或いはその関連物質を自身で合成できる能力が潜在していることが推定された。そこでこの能力を効果的に引き出すために supplement としての増殖促進物質を加えることなく YIGADHA-S 培地のみを用い、遠沈操作 (275g × 4分) により培地交換を繰り返すことでより適応能力の高いアメーバを選択しようと試みた。その結果増殖数には現時点で株間で大きな差が見られるものの実験に用いた5株全てが supplement なしに増殖し得る能力を獲得できることがわかった (Fig 1)。また単純な構造をもつ鉄-硫黄蛋白であるルブレドキシンについては葉緑素との複合体形成を必要とすることなく還元剤処理のみで増殖促進活性が見られたことから、増殖促進物質としてのルブレドキシンの鉄-硫黄中心を無機化学的に合成する試みも開始している。

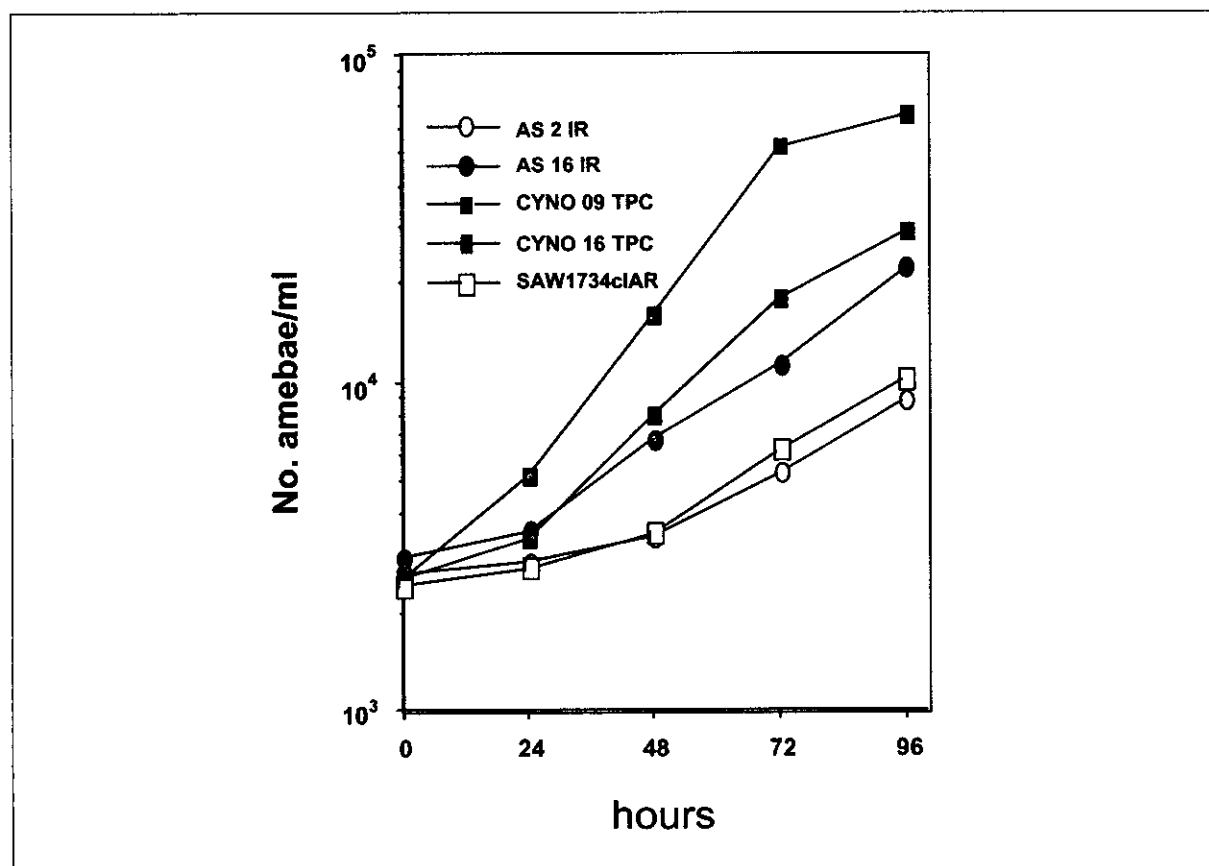


Fig 1 YIGADHA-S 培地の無菌培養条件に適応した5株の増殖曲線

## 2 *In vitro* 細胞毒性試験

Culture chamber に HeLa 細胞と CHO 細胞を培養し 48 時間後に培地を除き新しい D-MEM 培地を加えこの操作を 3 回繰り返すこと及びヒペロテングにより浮遊細胞を除き、新鮮なアメーハ用培地 (YIGADHA-S 或いは BI-S-33) と D-MEM 培地とを 1:1 に混合した培地 (2ml) に最終濃度が 10mM になるように ethidium homodimer を加え、これに 5000-10000 個の *E. dispar* と *E. histolytica* アメーハ栄養型をそれぞれの chamber に加えアメーハと細胞とを接触させ、アメーハの細胞毒性の有無を 2 時間倒立顕微鏡下で観察した。その結果 virulence の高い HM-1 IMSSc16 株では 45 分以内に HeLa 細胞と CHO

細胞何れを用いた場合でもアメーハに接触した細胞の中に細胞死を示唆する蛍光をもつ細胞が出現し始めた (Fig 2)。これに対し *E. dispar* (CYNO 16 TPC 株) では 2 時間経過しても全く細胞死を示唆する蛍光は見られず、細胞毒性は見られなかった。また virulence を失った Rahman 株も CYNO 16 TPC 株同様細胞毒性は見られなかった。細胞死の正確なメカニズムは不明であるか HM-1 IMSSc16 が vertebrate 細胞に接触することで細胞の浸透圧に変調を引き起こしたために ethidium homodimer の取り込みか起きたものと考えられ、この色素を用いることでアメーハが誘導する細胞死の瞬間を初めて捉えることができた。

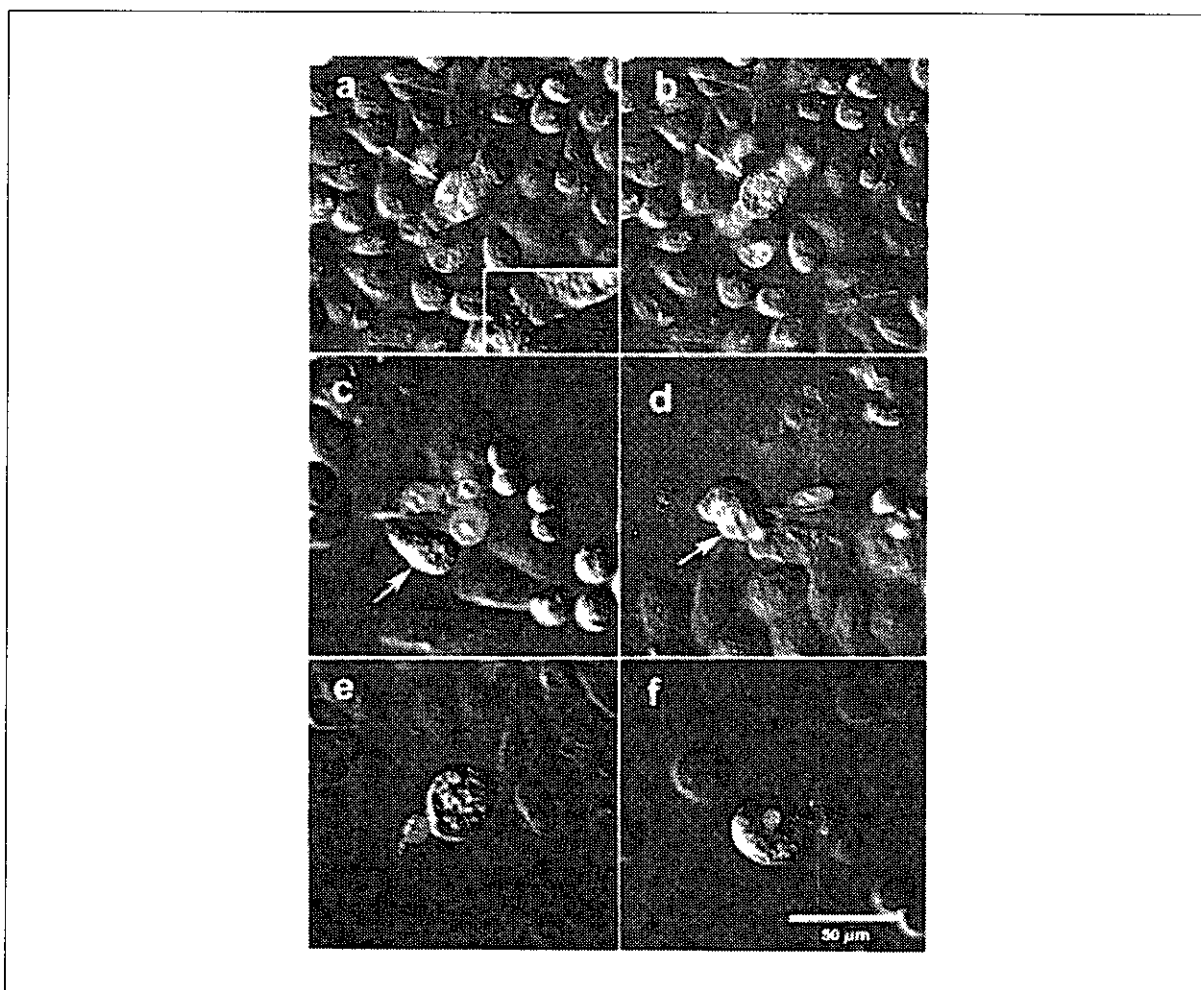


Fig 2 (HM-1 IMSSc16) が vertebrate cell に接触することで誘導された細胞死

- (a) アメーハの前、後方部分において 3 個の vertebrate cell が接触している。未だ蛍光は見られていない。
- (b) 約 2 分後の (a) と同じ視野。細胞死が誘導された瞬間。2 個の vertebrate cell の核に蛍光が見られアメーハの下方にも不明瞭ながら 1 個の蛍光をもつ vertebrate cell の核がみられる。
- (c),(d) アメーハ (矢印) と vertebrate cell が接触することで細胞死の誘導を示す蛍光を帯び始めた細胞。細胞は chamber の底面からはがれ始めている。
- (e) アメーハと接触し、蛍光が見られている vertebrate cell の一部。他の細胞部分は chamber の底面に未だ付着している。
- (f) 蛍光色素を取り込んだ vertebrate cell を食食したアメーハ

## 考 察

*E. histolytica*の代謝系においてフェレドキシンはピルビン酸のanaerobic oxidationに関与する redox proteinとして重要な役割を担うことが知られている。フェレドキシンを多量に含有する植物葉肉細胞に高い *E. dispar* の増殖促進効果が得られたことはこれらフェレドキシンの構成成分が *E. dispar* の増殖に必要な物質 (*E. dispar* のフェレトキシシン?) を合成するための材料として利用される可能性を示している。またこの増殖促進因子に依存して増殖していた *E. dispar* の5株全てが YIGADHA-S 培地を用いて無菌的培養条件下で時間をかけて適応させることで *E. dispar* が本来もっている潜在的な代謝能力を引き出すことが可能であることがわかり、実験に供した *E. dispar* 5株全ての無菌培養が可能となった。しかしながら株による無菌的培養条件への適応能力に大きな差が見られることから、鉄-硫黄を含む抵抗性の増殖促進因子を無機化学的に合成できれば、適応のための長期の培養期間や適応能力の差を見ることなしに容易に安定した無菌培養がてきめる可能性も高く、現在その可能性について検討している。また治療が困難な腸管腔に寄生する *E. histolytica* / *E. dispar* 治療薬としてこの安定した増殖促進物質のアナログが効果を示す可能性もあり、無機化学的な増殖促進物質の合成を行う過程で治療効果をもつ化合物のデザインも期待できる。

無菌培養された *E. dispar* の *in vitro* の系での細胞毒性については宿主細胞に接触することで引き起こされる細胞死のような virulence は肉眼的には判別し難い。今回マラリアのオオキネートが媒介蚊の中腸腺細胞のアポトーシスを誘導する瞬間を捉えることに成功した ethidium homodimer 色素を用いた方法をアメーハの細胞毒性判定に応用することで、病原性で virulence の高い *E. histolytica* が vertebrate 細胞に接触することで致死経過をたどった細胞をリアルタイムに顕微鏡下で画像として初めて捉えることができた (Dvorak et al, 2002)。無菌培養した *E. dispar* とともに実験動物への感染能力を失った病原性の *E. histolytica* も接触による細胞死誘導能力が見られなかったことから、この細胞毒性は株の違いや培養条件そして感染環境に

よっても影響を受ける可能性も示した。株間の virulence の違いについては、*E. histolytica* の多型性を示す遺伝子の解析から (Haghighi et al, 2002)、株の識別が可能となったことで *E. histolytica* 分離株間での比較検討が既に開始されており、我が国のある施設のアメーハ感染者からは極めて virulence が低く、遺伝子多型性のパターンも他の分離株と異なる株も分離されている。

## 結 論

- 1) オートクレーブ (121℃, 15分) 処理した *C. fasciculata* を supplement として YIGADHA-S 培地で *E. dispar* を年単位での長期培養後アメーハの密度を保ちながらこの supplement を除いて培養を続けることで無菌培養条件に適応し得ることが示された。
- 2) 最も単純な鉄硫-黄蛋白であるクロストリシウム (細菌) のルブレドキシンを還元剤処理し S-S 結合を切断、その後透析することで得られた物質に *E. dispar* の増殖促進効果を認めた。
- 3) ルブレドキシンの鉄-硫黄中心は無機化学的に合成が可能のため、現在この合成とともに、抗アメーハ作用を有する鉄-硫黄中心のアナログについての可能性についても検討を開始した。
- 4) Ethidium homodimer 染色法とコンピューター制御の倒立顕微鏡システムを用いることで初めて病原性の *E. histolytica* の接触による細胞死の過程を画像として捉えることに成功した。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

### 1 論文発表

- 1) Dvorak JA, Kobayashi S, Nozaki T, Takeuchi T, Matsubara C Induction of permeability changes and death of vertebrate cell is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp isolates Parasitol Int, in press (2003)
- 2) Haghighi A, Kobayashi S, Takeuchi T, Masuda G,

Nozaki T Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area J Clin Microbiol, 40(11),4081-4090 (2002)

## 2 学会発表参考文献

- 1) Shaden Ali Khalifa, Seiki Kobayashi, Eiko Imai, Tsutomu Takeuchi Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* chloroplast extract promotes the growth 第71回日本寄生虫学会 (2002)
- 2) Ali Haghghi, Mehreen Zaki, C Graham Clark, Seiki Kobayashi, Tsutomu Takeuchi, Ghoti Masuda, Tomoyoshi Nozaki Highly-polymorphic DNA of the *Entamoeba histolytica* isolates from Japan 第71回日本寄生虫学会 (2002)
- 3) 小林正規、清水泉大、堀宏治、今井栄子、齋藤智也、前田卓哉、竹内勤 ワークショップ 我が国における施設内赤痢アメーバに関する疫学調査 第71回日本寄生虫学会 (2002)

## 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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





## 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析

牧岡 朝夫<sup>1)</sup>、熊谷 正広<sup>1)</sup>、野崎 智義<sup>2)</sup>、竹内 勤<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> 東京慈恵会医科大学熱帯医学教室

<sup>2)</sup> 国立感染症研究所寄生動物部

<sup>3)</sup> 慶応大学医学部熱帯医学寄生虫学教室

### 研究要旨

蛋白質の翻訳後の脂質修飾であるファルネシル化はファルネシル転移酵素(FT)により触媒され、細胞内情報伝達分子として重要な低分子量G蛋白質Rasの膜への付加に必須であるばかりでなく、他の蛋白質との相互作用においても重要な働きをしている。Rasに突然変異が生じると細胞が癌化することが知られており、このRasの機能発現にファルネシル化が必須であることから、FTは抗癌剤の標的分子としても注目されている。今回、アメーバ症に対する新規薬剤開発の標的としての重要性を明らかにするため、赤痢アメーバのFT遺伝子のクローニング、組換え蛋白質の酵素学的解析を行った。赤痢アメーバFTのFT $\alpha$ 、FT $\beta$ サブユニットはそれぞれ298、375アミノ酸からなり、ヒトのFT $\alpha$  FT $\beta$ と29、36%の相同性を示した。この組換えFTはヒトのRas(-CVLS)に対して活性を示したが、変異型のRas(-CVLL)に対しては活性を示さなかった。調製した赤痢アメーバのC末端の異なる4種の組換えRas蛋白質(-CIMF、-CELL、-CSVM、-CVVA)の赤痢アメーバ組換えFTに対する基質活性を調べた結果、Ras(-CVVA)のみが基質活性を示した。また、高等動物FT阻害剤の赤痢アメーバ組換えFTに対する効果を調べた結果、赤痢アメーバ組換えFTはすべての阻害剤に対して抵抗性を示した。以上の結果から、赤痢アメーバFTと高等動物FTとの相違が明らかになり、標的分子としての重要性が示唆された。

分担研究者 竹内 勤

研究協力者 牧岡朝夫、熊谷正広、野崎智義

### Molecular characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica*

Asao Makioka<sup>1)</sup>, Masahiro Kumagai<sup>1)</sup>, Tomoyoshi Nozaki<sup>2)</sup> and Tsutomu Takeuchi<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Tropical Medicine Jikei University School of Medicine <sup>2)</sup> Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases and <sup>3)</sup> Department of Tropical Medicine and Parasitology, Keio University School of Medicine

## 研究目的

蛋白質の翻訳後の脂質修飾であるプレニル化は細胞内情報伝達分子として重要な低分子量G蛋白質の膜への付加に必須であるばかりでなく、他の蛋白質との相互作用においても重要な働きをしている。プレニル化にはファルネシル転移酵素(FT)に触媒されるファルネシル化とゲラニルゲラニル転移酵素(GGT)によるゲラニルゲラニル化がある。低分子量G蛋白質の一つであるRasはFTによりファルネシル化されるか、Rasに突然変異が生じると細胞が癌化することが知られている。このRasの機能発現にファルネシル化が必須であることから、FTは抗癌剤の標的分子としても注目され、特異的な阻害剤の開発が行われている。今回、アメーバ症に対する新規薬剤の開発を目的として赤痢アメーバのFTに注目し、その遺伝子のクローニング、組換え蛋白質の酵素学的解析を行った。

## 研究方法

FTは $\alpha$ と $\beta$ サブユニットからなるヘテロダイマーであることから、まず赤痢アメーバのFT $\alpha$ とFT $\beta$ のN末端とC末端の塩基配列をゲノムデータベースから得てFT $\alpha$ とFT $\beta$ それぞれのcDNA全長をPCRで増幅クローニングし、塩基アミノ酸配列を決定した。次に、FT $\alpha$ とFT $\beta$ のORFをプラスミド(pQE31)上にリボソーム結合部位をはさんでつなげ、発現プラスミドを作成した(Fig 1)。この発現プラスミドを大腸菌に導入し、IPTGにより発現を誘導した。発現したFT複合体はFT $\alpha$ のN末端側に付加したヒスチジンタグを用いて単離し、さらにQ-Sepharoseカラムクロマトグラフィーにより精製した(Fig 2)。酵素活性はヒト組換え

Rasへの[3H]ファルネシルピロリン酸の取り込みによって測定した。高等動物FT阻害剤として4種のファルネシルピロリン酸アナログと1種のペプチドミメティックスを用いた。FTの基質であるRasを赤痢アメーバから得るため、FTの場合と同様にゲノムデータベースの検索を行い、C末端塩基配列の異なる4種のRas遺伝子を得た。これらの遺伝子を導入した発現プラスミドを構築し、組換えRas蛋白質を調製した。

## 研究結果

赤痢アメーバのFT $\alpha$ 、FT $\beta$ サブユニットはそれぞれ298、375アミノ酸からなり、ヒト、*Arabidopsis thaliana*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Trypanosoma brucei*のFT $\alpha$ 、FT $\beta$ と24-36%の相同性を示した(Table 1)。FT $\alpha$ およびFT $\beta$ 組換え蛋白質は38kD、43kD蛋白質複合体として高い純度で精製された(Fig 2)。この組換えFTはヒトのRas(-CVLS)に対して活性を示したが、変異型のRas(-CVLL)に対しては活性が認められなかった(Fig 3)。また、FTの活性発現にはMg<sup>2+</sup>およびZn<sup>2+</sup>が必要であると報告されているが、赤痢アメーバFTもEDTAでこれらの2価イオンをキレートすることにより、活性が認められなくなった(Fig 3)。次に、FTの性質である赤痢アメーバRasの組換えFTに対する基質活性を調べるため、C末端の異なる4種の組換えRas蛋白質(-CIMF、-CELL、-CSVM、-CVVA)を調製した(Table 2)。このうちRas 1(-CIMF)、Ras 2(-CELL)についてはすでに報告されているものと一致し、Ras 3(-CSVM)およびRas 4(-CVVA)は今回新たに得られたものである。このうちRas 4は他の3種に比し、サイズが小さかった。赤痢アメーバ組換えFTがこれらの組換えRasに対して活性を

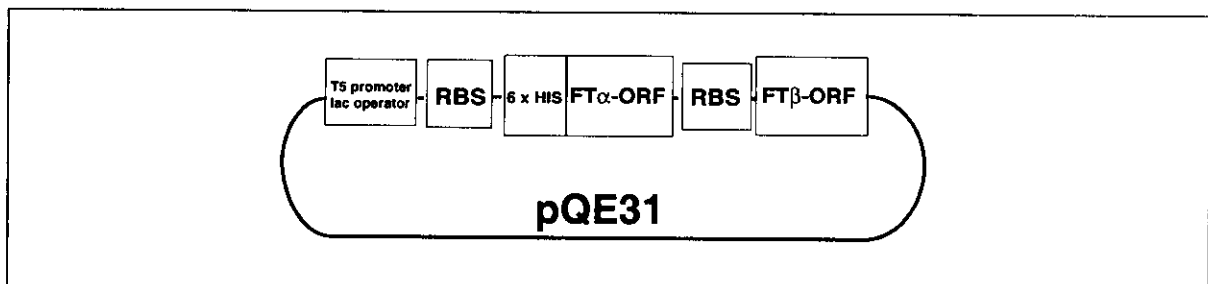


Fig 1 Construction of recombinant plasmid for expression of *E. histolytica* FT. RBS: ribosome binding site, HIS, histidine, ORF: open reading frame

示すかどうか調べた結果、Ras 4 (-CVVA)のみが基質活性を示した (Fig 4)。また、高等動物FT阻害剤の赤痢アメーバ組換えFTに対する効果を調べた結果、4種のファルネシル ヒロリン酸アナロ

グおよび1種のヘプチドミメティックスのIC50値はヒトFTの場合と比較して著しく高い値であった (Table 3)。

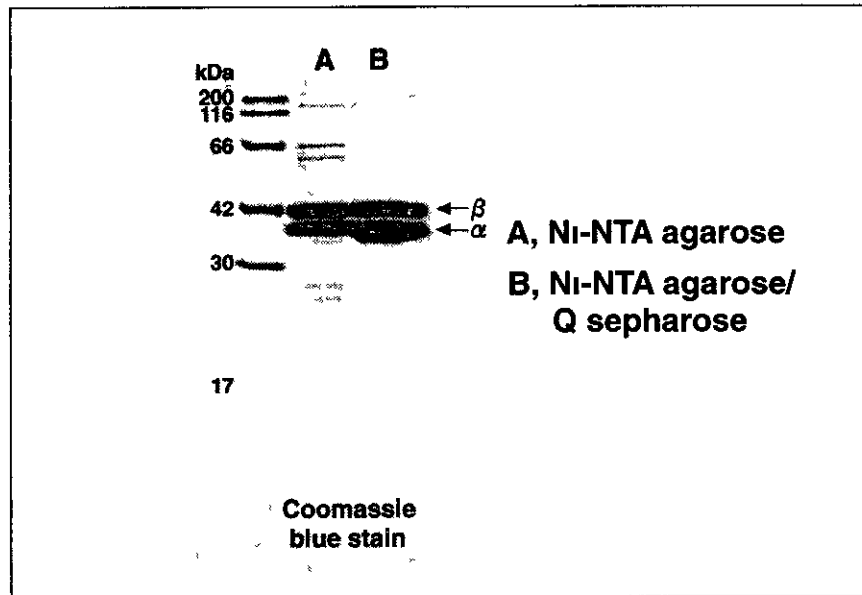


Fig 2 Purification of *E. histolytica* recombinant FT

Table 1 Comparison of amino acid sequences of *E. histolytica* FT with those of other organisms

	FT $\alpha$	Identity (%)	FT $\beta$	Identity (%)
<i>Entamoeba histolytica</i>	298 aa		375 aa	
Human	379	29	437	36
<i>Arabidopsis</i>	340	30	482	35
<i>Saccharomyces</i>	316	27	431	28
<i>Trypanosoma brucei</i>	612	24	585	31

Table 2 Comparison of C-terminal amino acid sequences of *E. histolytica* Ras

	C-terminal amino acid sequences
Ras 1	205aa CIMF
Ras 2	203 CELL
Ras 3	210 CSVM
Ras 4	182 CVVA

Table 3 Effect of mammalian FT inhibitors on *E. histolytica* recombinant FT

Inhibitor	IC <sub>50</sub> values	
	<i>E. histolytica</i> FT	Human FT
<b>Prenyl analogues</b>		
FPT inhibitor - I	> 30 $\mu$ M	75 nM
FPT inhibitor - II	~ 2 $\mu$ M	75 nM
Glotoxin	> 30 $\mu$ M	1 mM
$\alpha$ -Hydroxyfarnesyl phosphate	> 30 $\mu$ M	30 nM
<b>Peptidomimetics</b>		
FTI- 276	> 30 $\mu$ M	500 pM

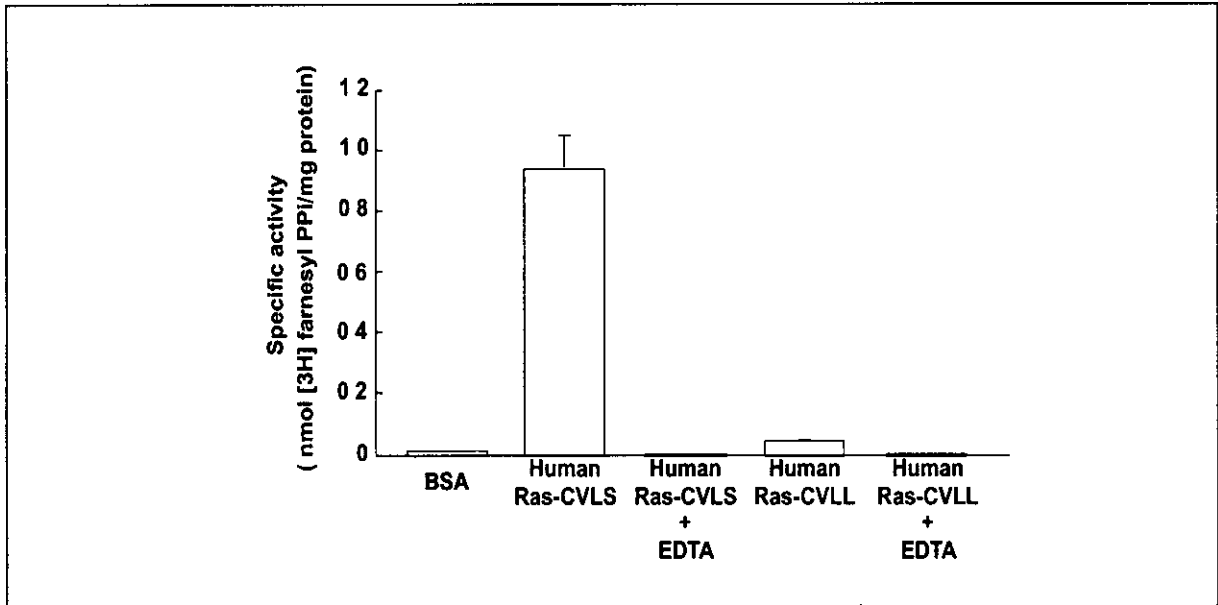


Fig 3 Assay of *E. histolytica* recombinant FT

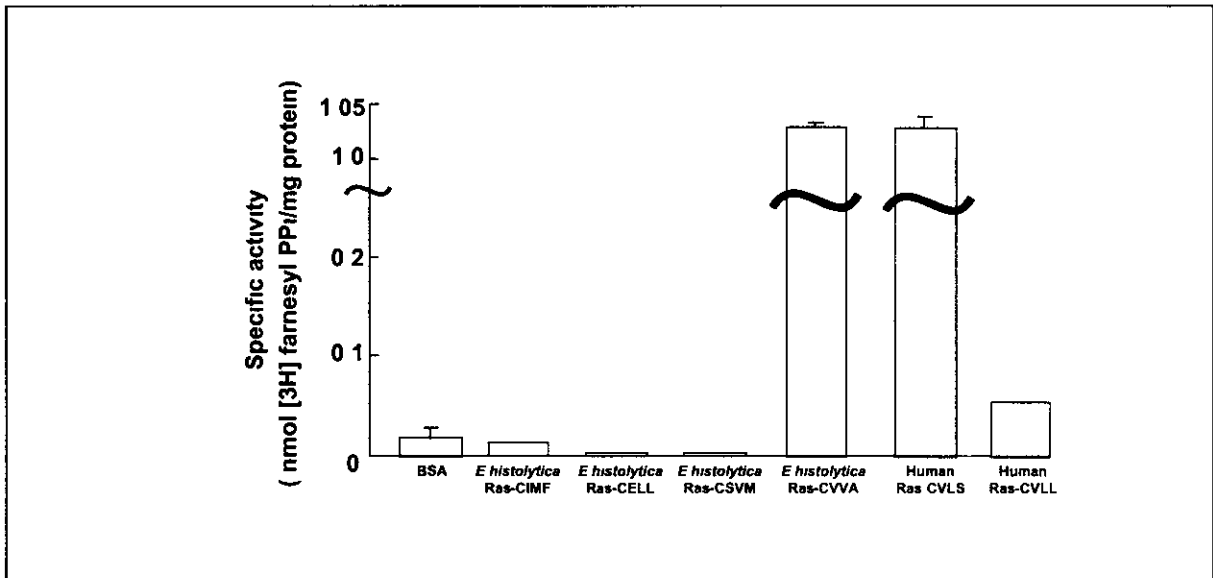


Fig 4 Substrate specificity of *E. histolytica* recombinant FT

## 考 察

赤痢アメーバFTのFT $\alpha$ 、FT $\beta$ サブユニットはそれぞれ298、375アミノ酸からなりこれまで報告されているヒトを含む他の生物のFTと比較して最も小さいサイズであった。ヒトを含む高等動物FT間の相同性に比し、赤痢アメーバとヒトFTの相同性は低い値であった。

2つのサブユニットからなるヒトFTを大腸菌で

発現させるために、両サブユニットのORFをリホノーム結合部位をはさんでつなげた発現プラスミドを構築する方法が用いられたが、この方法は今回の赤痢アメーバFTの場合にも有用であった。また、N末端に付加したヒスチシン タグにより、組換え蛋白質の精製も容易に行え、非常に高い純度の組換えFTが得られた。組換え蛋白質の性状を調べるうえでその純度は重要であり、今回得られた組換えFTは十分にその目的にかなうものと考え