

えられた。FTによりファルネシル化を受ける蛋白質はそのC末端にCAAX(Cはシステイン、Aはaliphaticなアミノ酸、Xは末端のアミノ酸)と呼ばれるモチーフを共有し、このモチーフをFTが認識する。末端Xのアミノ酸の多くはメチオニン(M)、システイン(C)、セリン(S)、グルタミン(Q)、アラニン(A)のいずれかと報告されている。今回のデータベースの検索で赤痢アメーバRasに関しては末端配列の異なる4種しか得られなかった。Ras3(-CSVM)はその末端がメチオニン(M)であったが、基質活性を示さず、赤痢アメーバFTは特有の基質特異性を示すことが示唆された。高等動物FT阻害剤を用いた実験結果から従来報告されているFT阻害剤は赤痢アメーバFTに対してはほとんど無効であることが明らかになった。このように赤痢アメーバFTと高等動物FTとの違いが明らかになり、新たな薬剤開発の重要な標的分子になると考えられた。

結 論

赤痢アメーバの組換えFTはヒトのFTと29-36%の相同性しか示さず、その基質特異性に関してヒトのFTとの違いが認められた。また、赤痢アメーバFTは高等動物FT阻害剤に対して著しく抵抗性があることが明らかになった。以上の結果から赤痢アメーバFTは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 proteasome inhibitors on the growth, encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens* Parasitol Res 88, 454-459 2002
- 2) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T Possible role of calcium ions, calcium channels and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* Parasitol Res 88, 837-

843 2002

- 3) Mizuno Y, Makioka A, Kawazu S, Kano S, Kawai S, Akaki M, Aikawa M, Ohtomo H Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of *Plasmodium falciparum* Parasitol Res 88, 844-848 2002
- 4) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dimnitroaniline herbicide oryzalin J Parasitol 88, 994-999 2002
- 5) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T *Entamoeba invadens* Inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin Exp Parasitol 2003 in press

2 学会発表

- 1) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dimnitroaniline herbicide oryzalin Conference on Amebiasis and the Biology of *Entamoeba histolytica* Agra 2002年2月。
- 2) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T Molecular characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica* Conference on Amebiasis and the Biology of *Entamoeba histolytica* Agra 2002年2月。
- 3) 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。
- 4) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義。赤痢アメーバのファルネシル転移酵素遺伝子のクローニングと発現。第71回日本寄生虫学会大会。伊勢原。2002年3月。
- 5) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T Possible role of calcium ion, calcium channel, and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* 10th International Congress of Parasitology Vancouver 2002年8月。
- 6) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by aphidicolin 第37回日米医学協力寄生虫疾患専門部会日米合同会議。長崎。2002年8月。
- 7) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by aphidicolin 第13回日独原虫病シンポジウム。長崎。2002年10月
- 8) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T Molecular cloning and characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba histolytica* 第13回日独原虫病シンポジウム。長崎。2002年10月。

- 9) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義。
赤痢アメーハのファルネシル転移酵素の解析。第75回日本生化学会大会。京都。2002年10月。
- 10) 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直咫、小林正規、竹内 勤。*Entamoeba*の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育に対するオリサリノの効果。第62回日本寄生虫学会東日本大会。新潟。2002年10月。
- 11) 牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤。*Entamoeba*の増殖および分化へのプロテアソームの関与。第43回日本熱帯医学会大会。高知。2002年11月。
- 12) 牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義。
赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析。第43回日本熱帯医学会大会。高知。2002年11月。
- 13) 牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤。*Entamoeba*の増殖と分化に及ぼすプロテアソーム阻害剤の効果。第35回日本原生動物学会大会。高知。2002年11月。
- 14) 牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義。
赤痢アメーハのファルネシル転移酵素の解析。第35回日本原生動物学会大会。高知。2002年11月。
- 15) 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直咫、小林正規、竹内 勤。*Entamoeba*の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育に対するカルシウムイオンおよびカルモデュリン阻害剤の効果。第72回日本寄生虫学会大会。久留米。2003年3月。
- 16) 熊谷正広、牧岡朝夫、渡辺直咫、竹内 勤、野崎智義。赤痢アメーハのファルネシル転移酵素の解析(2)。第72回日本寄生虫学会大会。久留米。2003年3月。

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



赤痢アメーバ接着因子の遺伝子クローニングと中和抗体エピトープの解析

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

赤痢アメーバが感染して病原性を発揮するには、宿主細胞に接着することが必須の過程であり、その過程を阻止することがアメーバ症の予防や治療につながる。接着には、虫体表面に存在する260-kDaのガラクトース (Gal) N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 特異的レクチンの関与が知られているが、最近我々は、これとは別の150-kDaのGal/GalNAcレクチンの存在を明らかにした。今回、遺伝子クローニングを行ったところ、150-kDaレクチンは1101アミノ酸(aa)のうち、約12%ものシステインを含み、その多くがCXXCとして存在する特異な蛋白質であることが明らかになった。このレクチンについて、アメーバ症の予防と治療への応用をめざして、全長と様々な断片を組換え蛋白質として大腸菌で作製し、各種抗体との反応性を調べた。その結果、N末端側に比べてC末端側の抗原性が高いこと、接着中和抗体のエピトープがaa 603とaa 753の間、およびaa 989とaa 1088の間に存在することが明らかになった。

分担研究者 竹内 勤

研究協力者 橋 裕司、程 訓佳

Molecular cloning of the 150-kDa lectin of *Entamoeba histolytica* and mapping of neutralizing antibody epitopes on its recombinant proteins

Hiroshu 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感染症として注目され、最近ではHIVとの混合感染例が増加している。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。接着には虫体表面に存在する260-kDaのガラクトース (Gal) N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 特異的レクチンの関与が知られている。一方で我々は、150-kDaの表面蛋白質を認識するモノクローナル抗体が、虫体の宿主細胞への接着や赤血球貪食能、実験動物における肝臓瘍形成を阻止できることを見だし、モノクローナル抗体で精製した150-kDa蛋白質も同様の特異性をもったレクチンであることを報告した。150-kDaレクチンを標的とした赤痢アメーバ症の予防・治療方法を確立することをめざし、今回、150 kDaレクチンの遺伝子クローニングを行うとともに、組換え蛋白質を調製して接着中和抗体のエピトープマッピングを試みた。

研究方法

1 150-kDaレクチン遺伝子のクローニング

赤痢アメーバ HM-1 IMSS 株の栄養型培養虫体から、マウスモノクローナル抗体 (EH3015) を用いたアフィニティクロマトグラフィーによって150-kDa蛋白質を精製し、N末端のアミノ酸配列を決定した。その配列に基づいて degenerate プライマーを設計し、HM-1 IMSS株のゲノムDNAをPCR増幅した。得られたDNA断片をプローブとして、赤痢アメーバHM-1 IMSS株のcDNAライブラリーをスクリーニングした。最長のインサートを含むクローンをpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。不完全長であった5'末端は5'-RACEによって伸長し、塩基配列決定を行った。

2 150-kDaレクチン組換え蛋白質の作製

N末端のシグナル配列を除く全長のアミノ酸 (aa 14-1101)、N末端側 (aa 14-382、N断片)、中央部 (aa 294-753、M断片)、C末端側 (aa 603-1088、C断片) をコードする遺伝子をPCR増幅し、それぞれpET19bヘクターのXhoIサイトに組み込み、大腸菌に導入して発現させた。inclusion bodyを回収した後、refoldingを行った。また、さらに小さい断片であるC1断片 (aa 749-873)、C2断片 (aa 877-975)、C3断片 (aa 989-1088)、C01断片 (aa 603-873)、C23断片 (aa 877-1088) も同様にして作製した。

3 抗150-kDaレクチン抗体

虫体からEH3015でアフィニティー精製した150-kDa蛋白質を用いてハムスターを免疫し、抗血清を得た。また、これまでに作製したマウスモノクローナル抗体の中から組換え蛋白質に反応する抗体を選別した。それぞれの抗体について、赤痢アメーバ栄養型虫体のチャイニーズハムスター卵巣細胞への接着に対する中和活性の有無を調べた。

4 トロフトプロット解析

ニトロセルロース膜に組換え蛋白質をプロットし、抗レクチン抗体、2次抗体、基質を順次反応させ、発色させた。

(倫理面への配慮)

動物実験は所属機関の動物実験委員会の承認のもとに指針に従って実施した。

研究結果

cDNAライブラリーからクローニングされた150-kDaレクチン遺伝子は、1101個のアミノ酸 (aa) をコードしていた (図1)。この配列から予想される蛋白質の分子量は119,512Da、pIは5.52であった。N末端側の13aaとC末端側の13aaには疎水性のシグナル配列が認められ、このレクチンはGPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型の膜糖タンパク質であると考えられた。また、1101アミノ酸の内、約12%ものシステインが含まれており、そのうちの多くがCXXCというモチーフを形成していた。データベースを検索し、新規の赤痢ア

メーバ蛋白質であることが確認された。

この蛋白質をN末端側(N断片)、中央部(M断片)、C末端側(C断片)に分けて、組換え蛋白質を作製した(図2)。また、N末端側のシグナル配列のみ除いた全長の組換え蛋白質も調製した。これらの組換え蛋白質と、虫体から精製した150-kDa蛋白質で免疫したハムスターの血清との反応性を、ドットプロットで調べた。全長の組換え蛋白質の反応性が最も強く、ついでC断片、M断片、N断片の順であった(図3)。また、赤痢アメーハ

の宿主細胞への接着を阻止できる4種類の中和モノクローナル抗体(mAb 1~4)と中和活性のない1種類のモノクローナル抗体(mAb 5)について、組換え蛋白質との反応性を調べた。これらの抗体はいずれも全長の組換え蛋白質と反応したが、mAb 1とmAb 4は3つの断片とは反応せず、高次構造を認識していると考えられた。また、mAb 2はC断片に反応し、mAb 3はM断片とC断片の両方と反応した。一方、mAb 5はN断片と反応した。エピトープの位置をさらに絞り込むため、C断片

| | | |
|------|---|------|
| 1 | <u>MFILLLFISISL</u> GDYTADKLIIGGKEPREAVPHCASVSN [*] NGACTSCDTGYELTTGNNKTCT [*] | 60 |
| 61 | LKEDMCKTAFSYYDKTNS [*] TNPKCTYCVNGKEVNTSSHS [*] GNDKCVCKNNVNICESCLLMKD [*] | 120 |
| 121 | SKCGECIIGMSTTV [*] DGSKLCDNATEDHAENC [*] VLLASSTSSKTC [*] DKCFGMYSLQGGKCT [*] | 180 |
| 181 | QKNDKINKCILQVENS [*] CNQCADGYSLS [*] TDKKS [*] CNKFPEHCSKINGNQCLTCMEGYLSKT [*] | 240 |
| 241 | DSKCTICTVDNPN [*] NLSE [*] GNES [*] IYNAE [*] HCTSC [*] NKRCTVSDGVC [*] VKNH [*] CRLFS [*] PTEENKCT [*] | 300 |
| 301 | KCDNGYFLTTS [*] GTCS [*] PNLYD [*] GFKTAN [*] RTECEN [*] GYLEKDGDK [*] KRCSL [*] CPDPFTECLTSKT [*] | 360 |
| 361 | PVPGKLNLRSSHLT [*] STDG [*] PCKLPG [*] LLCS [*] DDDTICYK [*] ENGLTLN [*] GTHCYN [*] FDTKSVLGT [*] | 420 |
| 421 | SGNNHQVCKMRGYD [*] QYEQYLNA [*] FKASDN [*] TYCPLK [*] LDLYLPYY [*] FSVTKG [*] TS [*] DN [*] ITIGCVG [*] | 480 |
| 481 | QLRNVSN [*] DCECND [*] KHIPT [*] SIDKAS [*] DCVSI [*] TTKLP [*] SCERTANG [*] NICTQ [*] CPV [*] SHV [*] GKDGK [*] C | 540 |
| 541 | SCGDAHYFDKDN [*] VCKK [*] CPASC [*] SSCS [*] YDSS [*] SKSV [*] VCSE [*] YENIQ [*] GV [*] TTRNK [*] ENECAC [*] INDG [*] | 600 |
| 601 | YKEGPN [*] AEDKKK [*] SQA [*] LNN [*] NCK [*] KEG [*] KYEIS [*] DGFV [*] TCLDC [*] DSAY [*] IVGS [*] QV [*] GACT [*] QCSP [*] NA | 660 |
| 661 | FKDEN [*] NK [*] Q [*] LC [*] STK [*] Q [*] SQY [*] GHCA [*] ACS [*] ATA [*] CIT [*] CED [*] INL [*] ILT [*] GEK [*] PCT [*] VCK [*] DGFY [*] Q [*] IEN [*] ATD | 720 |
| 721 | GVYCS [*] PC [*] PA [*] KCK [*] TCK [*] YNT [*] TSK [*] KVE [*] CVT [*] CTE [*] QRL [*] KDI [*] KA [*] PE [*] CAC [*] PT [*] GT [*] VQ [*] LE [*] NG [*] T [*] Q [*] SC [*] SD | 780 |
| 781 | LSKY [*] PG [*] CK [*] KT [*] DS [*] CNV [*] DS [*] RT [*] GF [*] IYATE [*] CS [*] DGF [*] SGR [*] SP [*] YS [*] NCT [*] TCT [*] KS [*] N [*] Y [*] PK [*] E [*] GE [*] K [*] NG [*] CA [*] K | 840 |
| 841 | CDDK [*] CAT [*] CS [*] DK [*] DT [*] CL [*] TCAD [*] PL [*] KV [*] GS [*] KCD [*] GG [*] CK [*] TG [*] YMS [*] NGE [*] CK [*] PCT [*] NH [*] CSE [*] CS [*] AAE [*] CT [*] V [*] C | 900 |
| 901 | ESDY [*] KVIS [*] GN [*] GCNS [*] CV [*] DGF [*] YFDE [*] IKG [*] T [*] CIP [*] TP [*] S [*] PCT [*] KCV [*] GV [*] KKD [*] CEE [*] QET [*] GCN [*] SE [*] KK [*] KI | 960 |
| 961 | VEECT [*] K [*] CS [*] TK [*] DH [*] IAE [*] VPV [*] NGAC [*] VCAY [*] GYVE [*] GTST [*] EDN [*] KIE [*] CQ [*] ACK [*] AKV [*] NE [*] FC [*] DC [*] SN [*] SK [*] KDC | 1020 |
| 1021 | LRCNA [*] EY [*] LEA [*] KGG [*] EC [*] VC [*] VE [*] GY [*] YTSS [*] WG [*] SCIP [*] CSR [*] HMP [*] HCT [*] KCT [*] GEG [*] ECT [*] TCED [*] GW [*] KL [*] KDG | 1080 |
| 1081 | KCN [*] GAKGIFIMMIVMLAFME | 1101 |

図1 赤痢アメーバ150-kDa表面レクチンの予想アミノ酸配列
*はンステインの位置、下線はシグナル配列を示す

をさらに3つに分けたC1、C2、C3断片を調製した(図4)。また、M断片とC断片のオーバーラップする箇所とC1を含む断片(C01断片)、C2とC3を含む断片(C23断片)を作製した。その結果、mAb2は

C3とC23断片に反応し、mAb3はC01断片のみと反応した(図5)。以上の結果から、mAb3のエピトープはaa 603とaa 753の間、mAb2のエピトープはaa 989とaa 1088の間に存在すると推定された。

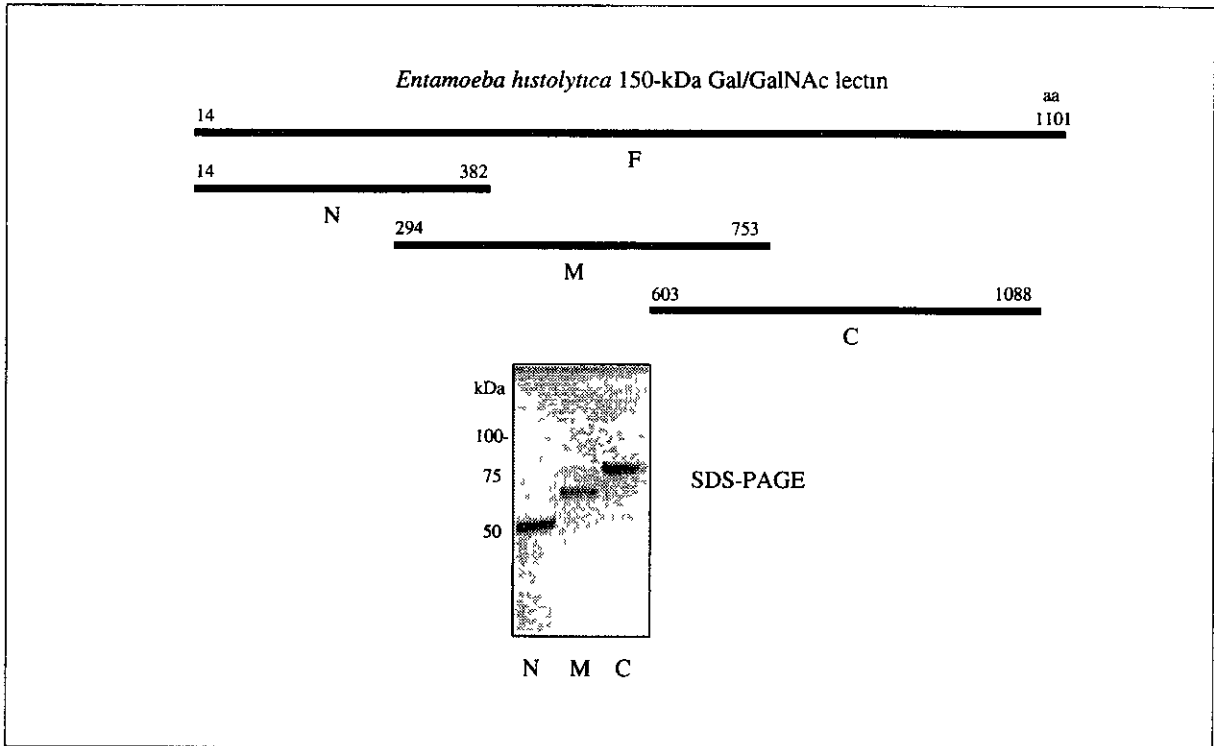


図2 赤痢アメーバ150-kDaレクチンにおける組換え蛋白質断片のアミノ酸領域と精製組換え蛋白質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像
太線の上の数字はアミノ酸番号を示す

| Antibody | Inhibition of adherence | F | N | M | C |
|---------------|-------------------------|---|---|---|---|
| Polyclonal Ab | + | ● | ● | ● | ● |
| mAb 1 | + | ● | | | |
| mAb 2 | + | ● | | | ● |
| mAb 3 | + | ● | | ● | ● |
| mAb 4 | + | ● | | | |
| mAb 5 | - | ● | ● | | |

図3 ドットプロットにおける赤痢アメーバ150-kDaレクチンの組換え蛋白質断片と各種抗体との反応性
+ 接着阻止活性あり - 接着阻止活性なし

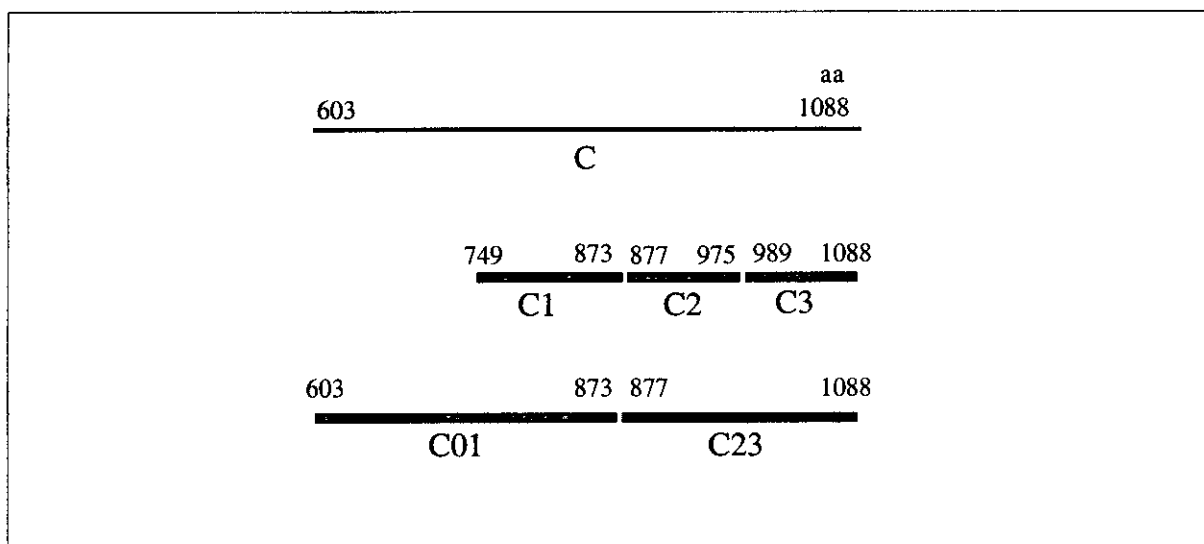


図4 赤痢アメーバ150-kDa レクチンC 末端側における組換え蛋白質断片のアミノ酸領域
数字はアミノ酸番号を示す

| Antibody | Inhibition of adherence | C1 | C2 | C3 | C01 | C23 |
|---------------|-------------------------|----|----|----|-----|-----|
| Polyclonal Ab | + | | | | ● | ● |
| mAb 2 | + | | ● | | | ● |
| mAb 3 | + | | | | ● | |

図5 ドットプロットにおける赤痢アメーバ150-kDa レクチンC 末端側組換え蛋白質断片と各種抗体との反応性

考 察

赤痢アメーバ150-kDa レクチンの一次構造が明らかになり、260-kDa レクチンとの差異が明確になった。260-kDa レクチンは、170-kDa の heavy subunitと呼ばれる膜貫通蛋白質と31/35-kDaのGPI アンカー型膜蛋白質である light subunitがS-S結合しており、このうち heavy subunit のシステインリッチな領域に糖認識部位が存在する。これに対

して、150-kDa レクチンもインステインリッチな蛋白質であったが、糖認識部位と考えられるような既知の配列は認められなかった。しかし、組換え蛋白質断片と中和抗体の反応性から、接着に関わるエピトープの局在を明らかにできた。また、多数存在するCXXC配列は、ホモロジーサーチの結果、ランブル鞭毛虫の variable surface glycoprotein にも認められた。このモチーフの意義については今のところ不明であるが、複数の接着中和抗体は

全長の組換え蛋白質とのみ反応したことから、システインによって形成される高次構造が、この蛋白質の機能に重要な意味を持っていると推定される。昨年度の報告書で述べたように、我々はアメーバ性肝膿瘍患者や無症候性嚢子排出者の末梢リンパ球由来の抗体遺伝子ライブラリーから、170-kDaのheavy subunitレクチンを認識する、接着中和活性を持ったヒトモノクローナル抗体Fab断片を大腸菌で作製している。今回150-kDaレクチンについて組換え蛋白質の作製が可能になったことから、それを用いてスクリーニングを行うことで、このレクチンに対するヒト抗体の作製も容易になると考えられる。

結 論

赤痢アメーバの接着因子の1つである150-kDaレクチンは、その遺伝子解析から、システインリッチなGPIアンカー型の膜糖タンパク質であることが判明した。この蛋白質における接着中和抗体のエピトープは、603番目から753番目アミノ酸の間と989番目から1088番目アミノ酸の間に存在すると考えられた。

健康危険情報

なし

研究発表

学会発表

- 1) 橋 裕司他 赤痢アメーバ150-kDaレクチン (Igl) の組換え蛋白質調製と性状解析 第43回日本熱帯医学会大会 2002年11月
- 2) 橋 裕司他 *Entamoeba dispar* 150-kDaレクチンの遺伝子クローニングと解析 第72回日本寄生虫学会大会 2003年3月

知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

(1) 特許取得

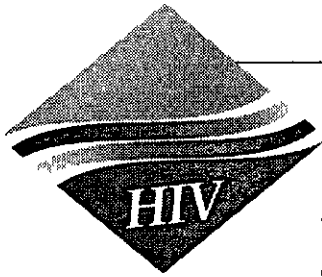
特になし

(2) 実用新案登録

特になし

(3) その他

特になし



クリプトスポリジウム感染SCIDマウスにおけるエリスロマイシン、ジョサマイシン、及びホスフォマイシンの感染抑制効果について

木俣 勲¹⁾、井関 基弘²⁾、竹内 勤³⁾

¹⁾ 大阪市立大学医学部医動物学教室

²⁾ 金沢大学医学部寄生虫学教室

³⁾ 慶應義塾大学医学部熱帯医学 寄生虫学教室

研究要旨

クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium parvum*)感染はHIV/AIDSに伴う日和見感染症として重要なものであるが、的確に効果を示す化学療法剤がまだ見いだされていない。このような状況に鑑み、本研究においてはSCIDマウスを使用して*C. parvum*の感染モデルをこれまでの研究で作成できたので、昨年を引き続いて有効な化学療法剤の探索を行った。今年度にテストしたのはエリスロマイシン、ジョサマイシン、ホスフォマイシンで、感染前投薬群と持続感染時投薬群の二群を作って検討した。その結果持続感染時には感染前投薬群の二倍の量の投薬を行ったが、有意な治療効果は見られなかった。しかしながらエリスロマイシン、及びホスフォマイシン感染前投薬群では糞便中のオーシストの数は約100分の1に減少し、明らかな感染予防効果が見られた。一方ジョサマイシンにはこの条件下では予防効果は見られなかった。

分担研究者 竹内 勤

研究協力者 木俣 勲、井関基弘

Protective Effect of Antibiotics on *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mouse

Isao Kimata¹⁾, Motohiro Iseki²⁾ and Tsutomu Takeuchi³⁾

¹⁾Department of Medical Zoology, Osaka City University, Medical School, ²⁾Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Kanazawa University and ³⁾Department of Tropical Medicine and Parasitology School of Medicine, Keio University

研究目的

HIV/AIDSは海外の状況もさることながら、わが国においても確実に増加傾向にあり、その動向の調査や診断、治療法の開発、感染予防の徹底など、課題は山積していると云わざるを得ない。この中でも、多岐に渉る日和見感染症の確実な診断、治療法の開発は緊急の課題であり、その中でも最も発生頻度の高いニューモシスティス肺炎、あるいは治療法の選択に課題を抱えるC型肝炎等と並んでクリプトスポリジウム症の治療法の開発は困難な課題として未解決のままになっている。本症は孢子虫類である *Cryptosporidium parvum* の感染によるもので、この原虫の発育自体が小腸上皮細胞の microvilli の中と云う特異な場所で起こるため、薬剤の到達が困難なことも予想され、免疫不全がない場合は自然に症状が消失するのに免疫不全がある場合は多くの治療に反応せず、致死的な感染に至る事が多い。

筆者らはこれまでの研究でSCIDマウスを使用して *C. parvum* の感染モデルを作成する事に成功し、アシスロマイシン、クラリスロマイシンなどが *C. parvum* 感染前から事前に投与しておくことでオーシスト排出を阻害する事を見出した。本研究はこの作業を更に継続発展させ、他の抗生物質の抗クリプトスポリジウム作用を検索する事を目的とした。

研究方法

1. 原虫

本研究では *C. parvum* の HNJ-1 株を通して使用した。この株は1989年に筆者らによって免疫機能正常なヒトから分離されたもので、以来 SCID マウスによって継代維持している。実験に際しては感染マウスの糞便から分離、精製した新鮮なオーシストを使用した。全ての実験は我々の施設において設定された動物実験のガイドラインに従って行われた。

2 使用マウス

全実験を通して、重症複合免疫不全マウス (CB-17/1cr-ScidJcl、5週齢、メス、日本クレア)を使用した。

3 オーシストの投与と薬剤投与スケジュール

本実験では二つの異なる実験系を作成した。前回の報告でもオーシスト投与前と投与後に薬剤による治療を開始すると云うスケジュールを作成したが、今回も同様にオーシストによる感染前薬剤投与群と感染後薬剤投与群の二つを作成した。今回使用した薬剤はエリスロマイシン (EM、Sigma)、シヨサマイシン (JM、和光純薬)、及びフォスフォマイシン (FOM、明治製薬) である。まず感染前薬剤投与群においては、上記の抗生物質の各々の 0.2mg を餌 1g に混合して作成した扮餌をオーシスト感染前三日前より五日間与えた。感染後投与群では、上記抗生物質のうち EM、FOM の各々を 0.4mg ずつを 1mg の餌に混合して扮餌とし、感染後 42 日目から 5 日間与えた。投与はこれらの薬餌を粉末餌給餌器に入れて自由摂食させた。

オーシスト投与は以下のように行った。すなわち感染前投与群では投薬開始三日目にオーシスト 10^5 個を経口ゾンデを使用して直接胃内に投与した。感染後投与群では 10^3 個のオーシストを同様の方法で投与した。対照群として投薬しないマウスには 10^5 及び 10^3 個のオーシストを同様に投与した。

4. 感染の評価

一日あたりの糞便中に排出されたオーシストの数を経日的に計数し、以下の計算式を用いて非線形回帰を行い平均化した。

$$y = a + b \times \exp(-c \times x)$$

得られた曲線をオーシスト排出パターンとしてマウスごとに比較検討した。

結果及び考察

1 薬餌の摂取量について

薬餌は粉末餌容器からの自由摂取としたが、一日あたり約 4g を摂取しているものと推定された。これを基礎として摂取された薬剤量を求めると、感染前投与群では一日あたり約 400mg/kg、感染後投薬群では 800mg/kg となった。

2. オーシスト経口投与後の糞便内排出数の経時的变化

コントロール群では図1a)に示す結果が得られた。オーシスト投与数と排出オーシスト数の増加のパターンは、投与数が少ない場合はグラフ上で右にシフトした形となった。

3 抗生物質投与の効果について

感染前投薬群における糞便中オーシスト排出の状況は図1b)にEM、図1c)にJM、そして図1d)に示した。効果の比較は一日あたりのオーシスト排出数の対数変換値が5.0になるまでに必要とする日数をもって行った。すなわちコントロール群との比較から、抗生物質の効果があれば、オーシスト産生が押さえられ、グラフの曲線は右にシフトすることとなる。

グラフより判断するに、EM投与群ではそれぞれ対数変換値が5.0になるのは感染後20, 21, 22日後であり、これらはコントロール群の 10^3 個のオーシスト投与群より更に右にシフトしており、明らかな感染予防効果があったものと推定された。このデータより推計するに、実際に感染したオーシスト数は感染前投薬により約1/100以下になったものと思われた。JMの場合は、それぞれ20, 10, 9.5日目に対数変換値が5.0となった。この結果

は二匹のマウスではコントロールの 10^6 投与群とほぼ同じとなっており、殆ど感染前投薬の結果は無かったものと判断された。FOMについては、それぞれ19, 20, 21日目に対数変換値が5.0となり、コントロール 10^3 投与群より更にグラフの曲線は右にシフトした。この場合も上記のEMと同様に実際に感染したオーシスト数は感染前投薬により1/100前後にまで落ちたものと推定された。

一方、感染後に投薬した場合は、感染前投薬の実験におけるよりも投薬量を二倍にまで増量して観察したか、投薬前後で排出されるオーシスト数に殆ど変化は無く、この時期でのEM, JM, FOMの投薬は無効と判断され、クリプトスポリジウムに直接作用して死滅させる効果は恐らく低いものであろうと思われた。

今回EM及びFOMを感染前に投与すれば感染予防効果が見られる事が判明した。この結果は一昨年報告したアシスロマイシン、クラリスロマイシンと同様な結果であった。一方JMについてはこのような作用は認められなかった。これらの薬剤の感染前投与の予防効果の機序は不明であるが、腸管内でのクリプトスポリジウムとの直接接触、すなわち原虫がmicrovilli内に侵入する前にある程度の殺滅効果を示したとまず考えられる。また一方ではこのような抗生物質が小腸に何らかの影響

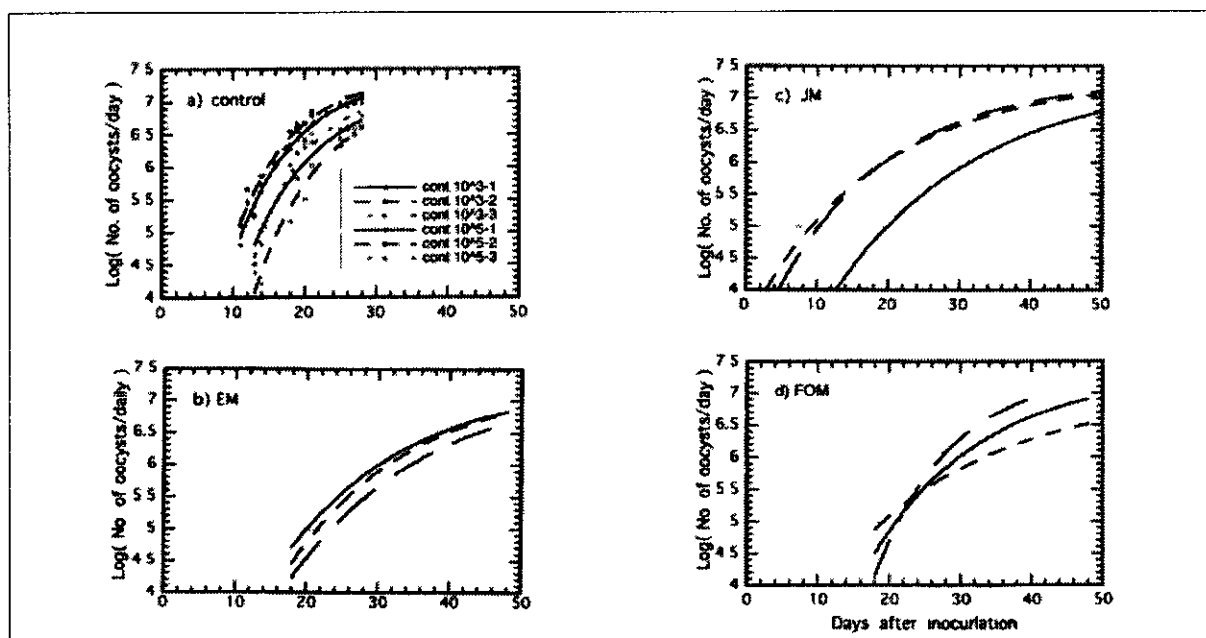


図1

を及ぼして、それが間接的にクリプトスポリジウムのmicrovilli内侵入の抑制などに関与している可能性も否定できない。

クリプトスポリジウム症の化学療法は現在全く確立されておらず、これまでの中ではクリンダマイシン、パロモマイシン、ニタゾキサニド等が現在テストされているが決定的なものではない。その他にも近縁の孢子虫であるトキノプラズマに効果がある薬剤もテストされたが、やはり治療に応用できるほどの効果は見られなかった。筆者らはこのような薬剤に加え、現在やはり近縁の原虫であり、AIDS にしばしば混合感染が起こる *microsporidia* に効果があると最近報告されたフマギリンとその類縁化合物の検索を開始している。

結論

クリプトスポリジウム症の化学療法剤探索のため SCID マウスを用いた実験系でエリスロマイシン、ジョサマイシン、フォスフォマイシンの効果に関して検討を行った。実験はオーンスト感染前と感染後に薬剤を投与する事で行ったが、オーンスト感染後の薬剤投与は全く効果が見られなかった。一方、感染前に薬剤を投与した群ではエリスロマイシン、フォスフォマイシンに感染抑圧作用が認められた。

健康危険情報

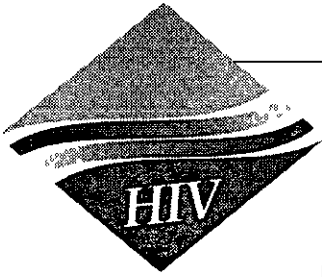
特になし

研究発表

本研究に関してはなし

知的財産権の出願・登録状況

現時点ではない



トキソプラズマのタキゾイト型虫体の ピルビン酸キナーゼの遺伝子組換え酵素の 発現とその性質

浅井 隆志¹⁾、野崎 智義²⁾

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

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、トキソプラズマの解糖系の律速酵素のひとつであるピルビン酸キナーゼの諸性質を調べたので報告する。遺伝子をクローニングして活性のある遺伝子組換え酵素を作製した。アミノ酸配列は同じコクシジウム科の原虫である *Eimeria tenella* と最も相同性が高く(63%)、他の生物のそれとは25%以下であった。遺伝子はシングルコピーと思われ、分子量58KDaのサブユニット4個から構成されるホモテトラマーと考えられる。他の生物のピルビン酸キナーゼと同様に基質であるフォスフォエノールピルビン酸 (PEP) の飽和曲線はS字状となり、典型的なアロステリック酵素であった。しかし良く知られたフルクトース1,6二リン酸 (F1,6BP) による活性化を受けず、代わりにグルコース6リン酸 (G6P) により活性化された。またフルクトース2,6二リン酸 (F2,6BP) が活性の抑制に働くなど、トキソプラズマのピルビン酸キナーゼには宿主細胞とは異なる特異な調節機構が存在することが判明した。

分担研究者 野崎智義

研究協力者 浅井隆志

Expression and characterization of recombinant pyruvate kinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoite
Takashi Asai¹⁾ and Tomoyoshi Nozaki²⁾

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

研究目的

トキノプラズマ症はエイズ患者に多発する難治性の原虫感染症である。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。

薬剤の標的となる代謝経路は各種考えられるが、我々はエネルギー代謝の中心的役割を担う糖代謝経路に注目して研究を継続してきた。糖代謝経路は古くからいろいろな生物種において研究されてきた経路で、初段を触媒するヘキソキナーゼ、経路のなかほとに位置するフォスホフルクトキナーゼ、経路の終盤のピルビン酸キナーゼが律速酵素であることが知られている。しかしトキノプラズマの糖代謝経路の諸酵素の性質はほとんど精査されていない。近年トキノプラズマのEST情報の集積により糖代謝関連酵素遺伝子のクローニングが容易になり、単一の遺伝子組換え酵素の諸性質を精査可能となった。

本研究の目的は、糖代謝経路を標的にしたトキノ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、糖代謝経路の律速酵素のひとつであるピルビン酸キナーゼの諸性質を明らかにする事である。

研究方法

a. ピルビン酸キナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定

トキノプラズマ RH 株の増殖体の cDNA ライブラリー (EST プロジェクトに使用されたもの) はケンブリッジ大学の James Ajoka 博士より供与されたものを使用した。EST データベースのピルビン酸キナーゼにヒットした情報 (#543446, GenBank ID#W35571) をもとにプローブを作製した。このプローブを用いてピルビン酸キナーゼの全長をコードする DNA をクローニングした。塩基配列を決定した後、各種のプログラムで解析を行った。

b. 遺伝子組換え酵素の作製と精製

ピルビン酸キナーゼの全長をコードする DNA 配列を PCR で作製し、アマーシャム社の発現用プ

ラスミド pGEX-5-1 に組み込み、GST-フュージョンタンパク質として大腸菌 BL21 株で発現させた。これをグルタチオンセファロース 4B に結合させた後 Factor Xa プロテアーゼでピルビン酸キナーゼを切り出した。このままではまだ混在するタンパク質があるので、DEAE-Toyo pearl 650S によるイオン交換クロマトグラフィーと Toyo pearl HW55s によるゲルろ過法で単一に精製した。

c. 酵素活性の測定

ピルビン酸キナーゼの活性は乳酸脱水素酵素とカップルさせた方法で NADH の減少を分光計で測定することで行った。活性の測定は同一サンプルで 3 回行い、データは酵素反応解析プログラム (SigmaPlot 2000) で解析した。

(倫理面への配慮)

該当せず。

研究結果

クローニングした cDNA は全長 2207bp で 1596bp のタンパク質コード部分 (ORF) を含み、計算上のピルビン酸キナーゼの分子量は約 58 kDa であり、等電点は 5.95 であった。サザンブロットの結果シングルコピー遺伝子であると思われる。

アミノ酸配列を他の生物の 6 種類のピルビン酸キナーゼと比較したものが図 1 である。最も相同性が高い (63%) のものが *Eimeria tenella* の酵素で、その他は 25% 以下と相同性はかなり低い結果であった。しかしピルビン酸キナーゼとしての基本的なコンセンサス配列 (基質、金属イオンの結合部位) は存在した。エフェクターの結合部位に関しては他とは異なるユニークな配列が確認された。

大腸菌に発現させ精製したトキノプラズマのピルビン酸キナーゼの電気泳動像が図 2 に示されている。分子量は計算上の値と等しい約 58 kDa であり、精製の最後のステップであるゲルろ過で 220-240 kDa の所に溶出されることから、活性のあるピルビン酸キナーゼは虫体の酵素と同様に四量体であると考えられる。

各種の糖リン酸化合物のピルビン酸キナーゼに与える効果が表 1 に示されている。トキノプラズ

マのピルビン酸キナーゼの最も特徴的な性質はG6PがPEPに対するKm値をアロステリックに減少させることである。PEPの濃度に依存した酵素活性のS-字状曲線がG6Pの存在下でハイパーボリックな曲線になることが図3に示されている。他の糖リン酸は活性化に関しては何ら効果を示さ

なかった。しかし高濃度のPEPの存在下でF2,6DPは活性を阻害した(図4)。もう一方の基質であるADPはならアロステリックな活性の変化に影響は与えなかった。カリウムイオンは活性と酵素の安定化に必須で、マンガンイオンが酵素を驚異的に活性化することがわかった(図5)。

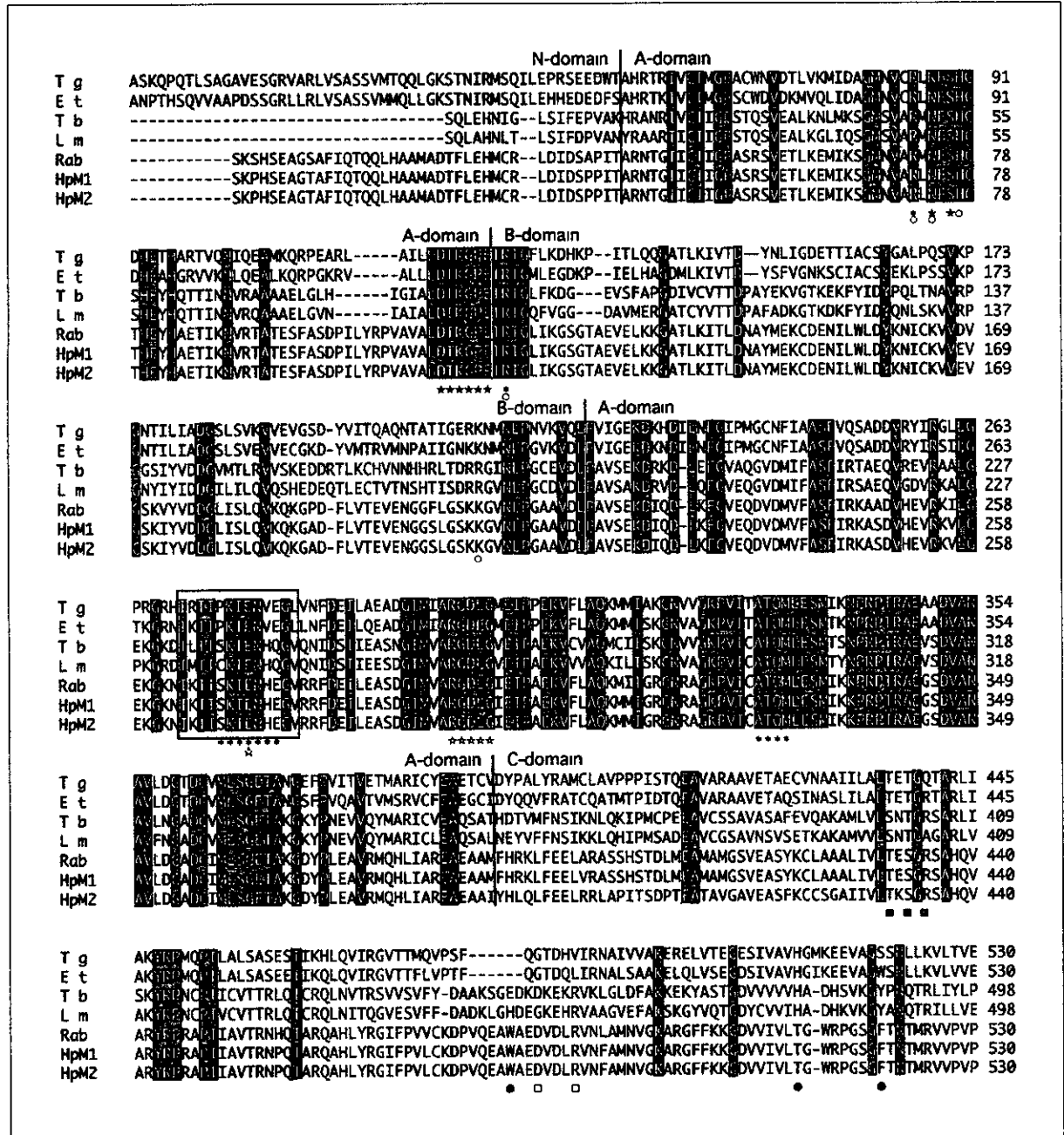


図1 トキノプラズマのピルビン酸キナーゼと他の生物の6種類のピルビン酸キナーゼのアミノ酸配列の比較
データベースの登録ナンバーは以下のとおりである Tg, *T. gondii* (AB050726), Et, *Eimeria tenella* (AF043910), Tb *Trypanosoma brucei* (X57950), Lm *Leishmania mexicana* (X74944), Rab, *Oryctolagus cuniculus* (Rabbit) muscle pyruvate kinase (15987970), HpM1 *Homo sapiens* muscle isozyme 1 (S64635), HpM2, *Homo sapiens* muscle isozyme 2 (NM_085209) 縦の線は三次元構造の四つ領域(N A B C)の境界線を表す。四角で囲んだ所はピルビン酸キナーゼのSignature配列を示す。白丸はADPの結合部位、黒丸はF1,6BPの糖部分の結合部位 白四角はF1,6BPの1リン酸の結合部位、黒四角はF1,6BPの6リン酸の結合部位、星印(Asterisks)はPEPの結合部位 白星は二価の陽イオンの結合部位、黒星は一価の陽イオンの結合部位をそれぞれ示す。配列の欠落をダッシュで示す

表1 ビルビン酸キナーゼに対する各種糖リン酸の効果

| 基質 | エフェクター | apparent K_m (mM) | V_{max} 比 (%) | Hill係数 |
|-----|-----------------------|---------------------|-----------------|-----------|
| PEP | None | 1.00±0.04 | 100 | 2.30±0.19 |
| | +グルコース 6-P (1mM) | 0.06±0.03 | 119 | 1.30±0.22 |
| | +グルコース 1-P (1mM) | 1.20±0.15 | 115 | 2.43±0.36 |
| | +フルクトース 6-P (1mM) | 1.05±0.23 | 103 | 1.92±0.19 |
| | +フルクトース1,6-BP (1mM) | 0.98±0.00 | 102 | 2.21±0.38 |
| | +フルクトース2,6-BP (10 μM) | 1.09±0.02 | 103 | 2.38±0.08 |
| | +リボース 5-P (1mM) | 1.12±0.03 | 95 | 1.97±0.32 |
| | +AMP (1mM) | 1.06±0.22 | 101 | 2.13±0.27 |
| | +ATP (1mM) | 1.12±0.09 | 88 | 1.97±0.30 |

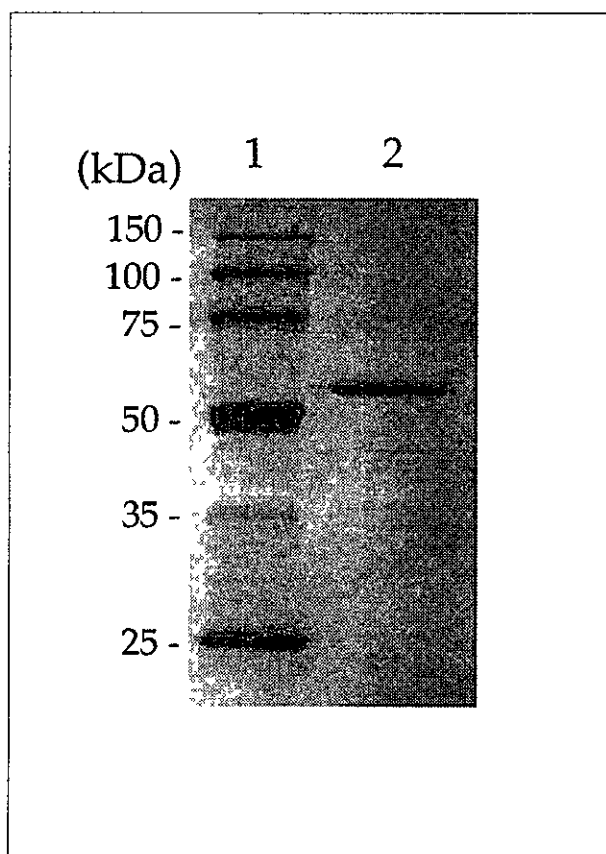


図2 精製されたトキノプラズマの遺伝子組換えビルビン酸キナーゼの SDS-電気泳動像
 レーン1 マーカータンパク。レーン2 3マイクログラムの精製されたトキノプラズマの
 遺伝子組換えビルビン酸キナーゼ。染色はクマンブルーR250で行われ、分子量はkDaで
 示されている

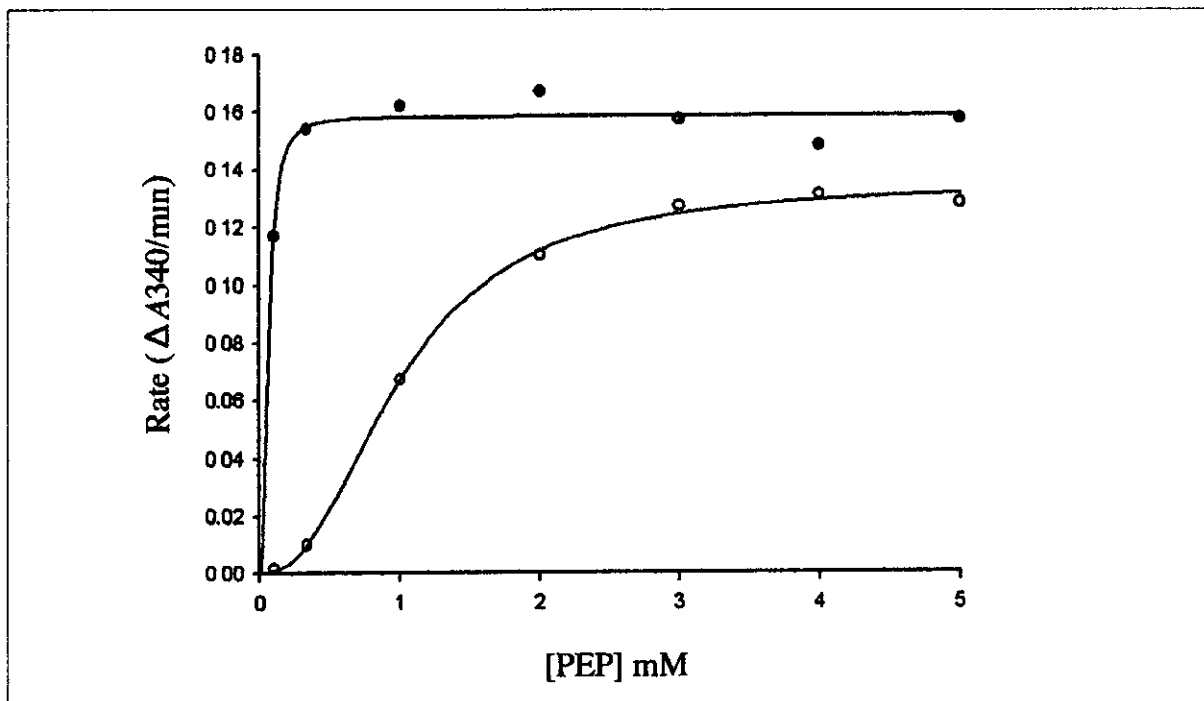


図3 PEPの飽和曲線に及ぼすG6Pの効果
(○), G6P非存在下、(●), 1 mM G6P存在下

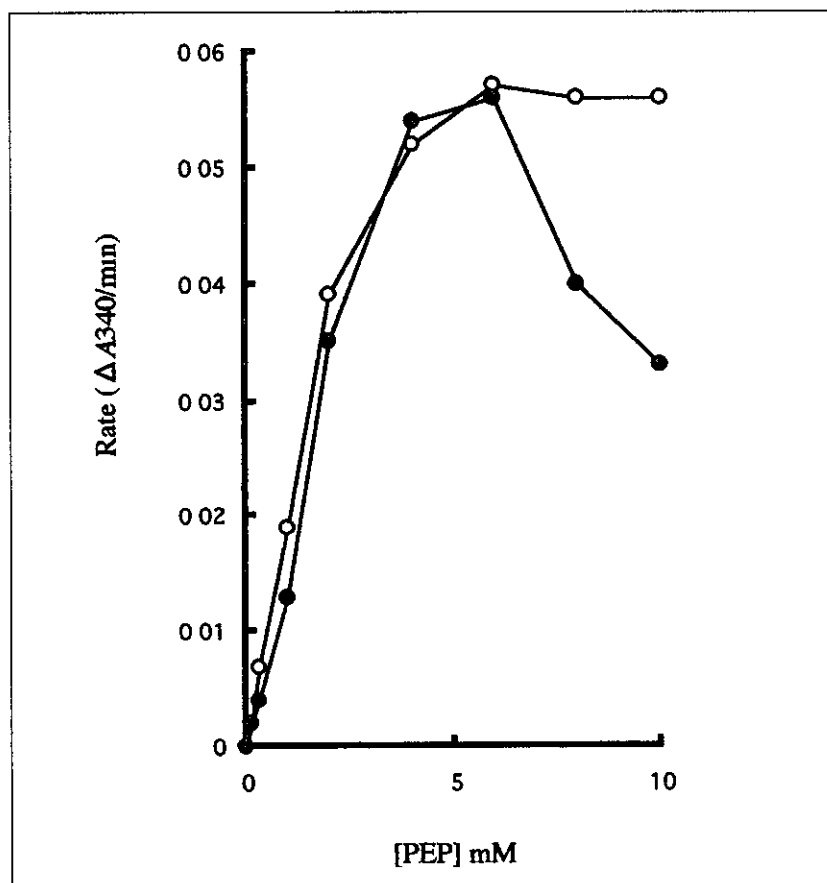


図4 PEPの飽和曲線に及ぼすF2,6BPの効果。
(○), F2,6BP非存在下、(●), 10μM F2,6BP存在下

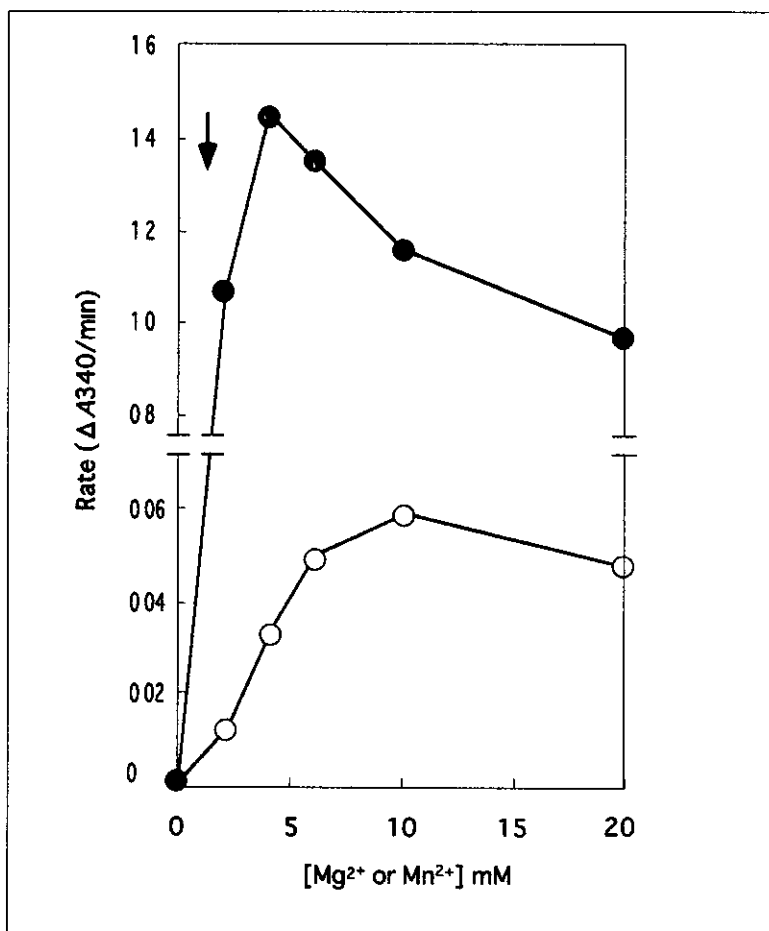


図5 1 mM ADP と 1 mM PEP における二価の陽イオンのピルビン酸キナーゼに与える効果 (○), 各種濃度の MgCl₂、(●), 各種濃度の MnCl₂。矢印は二価の陽イオンと ADP の濃度が同一となる点 (1 mM) を示す

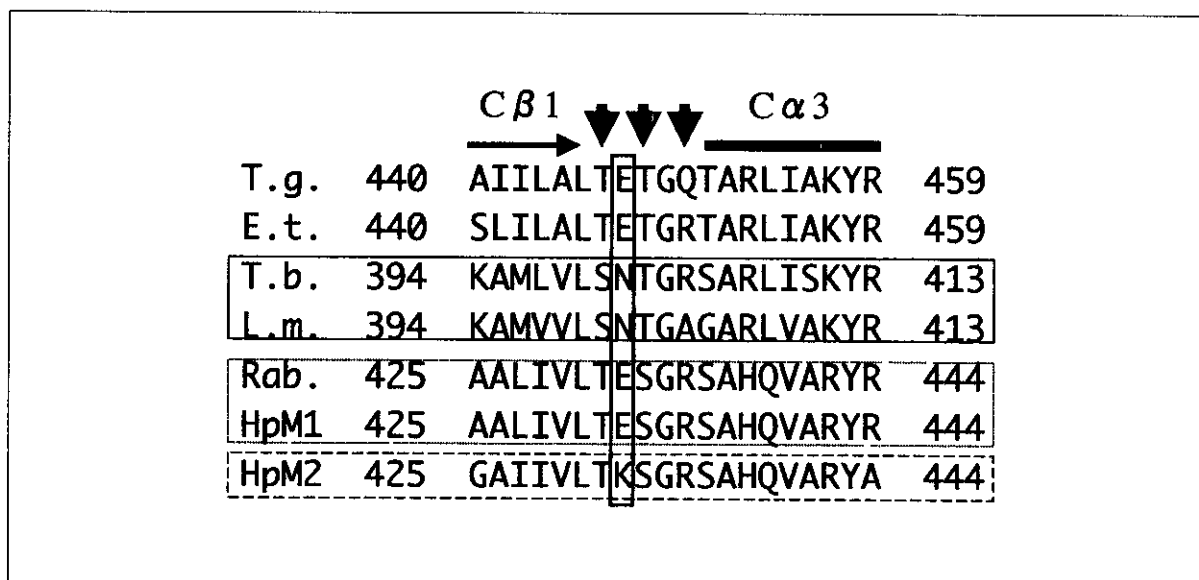


図6 図1における F1,6BP の 6-リン酸結合部位の拡大図

この結合部位はC領域のβ-1シートとα-3ストランドの結合部分に存在する。縦の矢印はF1,6BPの6-リン酸結合部位を示す。縦のボックスは結合に必須のアミノ酸、横のボックスはF2,6BPにより活性化されるピルビン酸キナーゼのグループ、横の細かい点線のボックスは糖リン酸により活性が影響されないノンアロステリック酵素、横の点線のボックスはF1,6BPにより活性化されるアロステリック酵素をそれぞれ示す

考 察

ピルビン酸キナーゼの三次元構造は基本的に四つの領域(N,A,B,C)に分けられる。トキソプラズマのピルビン酸キナーゼは長いN領域が特徴的である(図1)。N領域は真核生物に特徴的な部位であるがその機能は明らかではない。トキソプラズマ酵素の長いN領域に関しては今後その機能の解明が待たれる。A,B領域は全ての生物において基質と陽イオンの結合部位を含んでおり、どの生物でも非常に保存されている。トキソプラズマ酵素も例外なく基質と陽イオンの結合部位は非常に良く保存されていた。C領域はエフェクターの結合部位があり生物種によりかなり異なっているが、トキソプラズマ酵素も塩基の欠落などがあり他の生物との相同性はかなり低かった。C領域のF1,6BP結合部位の中の6-リン酸の結合部位をトキソプラズマ酵素と他の生物のそれらと比較したものが図6である。この部位は三次元構造的にエフェクターがはまり込むポケットを形成している。このポケットで必須のアミノ酸がトキソプラズマのピルビン酸キナーゼの場合、447番目のグルタミン酸(E)であり、これはウサギ筋とヒトのM1ピルビン酸キナーゼと同じであった。これらの酵素はF1,6BPにより活性化されるアロステリック酵素ではない事が知られている。したがって、トキソプラズマのピルビン酸キナーゼもこのエフェクターポケットを介した活性化を受けないことが構造からも明らかである。

トキソプラズマのピルビン酸キナーゼにはいくつかの特異的な性質があることか今回の研究で明らかとなったが、その内で最も特徴的な性質は解糖経路の初期産物であるG6Pによりアロステリックな活性化を受けることである。このことからG6Pの産生かトキソプラズマの解糖系においてその流れを調節する要因になっていることが確認された。G6Pによる活性化は他の生物において*E. tenella*と*Mycobacterium smegmatis*にのみ知られた性質であり、細胞内寄生と密接な関連があると思われるが、その解明は今後の重要な研究テーマである。

他の特徴的な性質としては、基質であるPEPが高濃度の時低濃度のF2,6BPが活性を阻害する事が

あげられる(図4)。F2,6BPはほ乳類のフォスホフラクトキナーゼ1のアロステリックな活性化因子であり、*Trypanosoma brucei*と*Leishmania mexicana*のピルビン酸キナーゼの活性化因子として知られている。現在まで酵素の活性阻害因子としての報告はなく今回の報告が初めてである。PEPが高濃度の時にのみ作用することから生理的に意味のある現象かどうかは不明であるが、トキソプラズマのピルビン酸キナーゼの三次元構造が解明されればその作用機構が明らかとなるであろう。

他に言及しなければいけない性質として、マンガニンイオンがトキソプラズマのピルビン酸キナーゼ活性を劇的に上昇させることがある。どの生物のピルビン酸キナーゼも二価の陽イオンの結合部位を持ち、二価の陽イオンによる活性化は共通の性質である。しかし今回報告するトキソプラズマのピルビン酸キナーゼのような劇的な変化を伴うものはない。トキソプラズマのピルビン酸キナーゼの三次元構造が明らかにされれば、二価の陽イオンによる活性化の機構がより解明されるであろう。

今回の研究でトキソプラズマの解糖経路においてG6Pが非常に重要な役目を果たすことが明らかとなった。経路の初段を触媒するヘキソキナーゼと他の律速酵素であるフォスホフラクトキナーゼはアロステリックな活性調節を受けないことがわかっている。ピルビン酸キナーゼだけが調節を受けることから、糖代謝経路の流れの調節に最も重要な酵素であることがわかった。

結 論

トキソプラズマの糖代謝経路の中核を担うピルビン酸キナーゼの性質を遺伝子組換え酵素を用いて精査した。その結果宿主細胞のそれとは明らかに異なる幾つかの性質が明らかとなった。今後これらの性質を標的にした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) Maeda T, Saito T, Oguchi Y, Nakazawa M, Takeuchi T, Asai T Expression and characterization of recombinant pyruvate kinase from *Toxoplasma gondii* tachyzoite Parasitol Res 2002, (in press, accepted September 2)
- 2) Asai T, Takeuchi T, Diefenderfer J, Sibley LD Identification of Small-Molecule Inhibitors of Nucleoside Triphosphate Hydrolase in *Toxoplasma gondii* Antimicrob Agents Chemother 2002, 46(8) 2393-2399
- 3) Saito T, Maeda T, Nakazawa M, Takeuchi T, Nozaki T, Asai T Characterisation of hexokinase in *Toxoplasma gondii* tachyzoite Int J Parasitol 2002, 32 (8) 961-967

2 学会発表

- 1) Masaharu Tokoro, Takashi Asai, Seiki Kobayashi, Masanobu Tanabe, Tsutomu Takeuchi, Tomoyoshi Nozaki Characterization of methionine g-lyase from *Entamoeba histolytica* a key enzyme of sulfur-containing amino acid degradation, Conference of amebiasis and the biology of *Entamoeba histolytica*, 2002
- 2) Tomoya Saito, Takuya Maeda, Tsutomu Takeuchi, Takashi Asai Characterization of Hexokinase in *Toxoplasma gondii* tachyzoite, Molecular Parasitology Meeting XIII, 2002
- 3) 浅井隆志、竹内勤、Mark Feiglin, Helen Profous-Juchelka, Dennis Schmatz, Jeff Diefenderfer, L David Sibley トキノプラズマNTPaseの阻害剤の検索 第71回日本寄生虫学会大会、2002,3
- 4) 前田卓哉、浅井隆志、斎藤智也、中沢幹、所正治、竹内勤 トキノプラズマにおけるピルビン酸キナーゼの検討—その特異な活性調節機構—第71回日本寄生虫学会大会、2002 3
- 5) 所正治、浅井隆志、小林正規、田邊将信、竹内勤、野崎智義 赤痢アメーバメチオニンγリアーゼの生理機能、阻害剤を用いた *in vitro*, *in vivo* 解析 第71回日本寄生虫学会大会、2002 3
- 6) 斎藤智也、浅井隆志、中沢幹、前田卓哉、所正治、竹内勤 トキノプラズマ解糖系酵素ヘキソキナーゼの解析 第71回日本寄生虫学会大会、2002 3

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし。