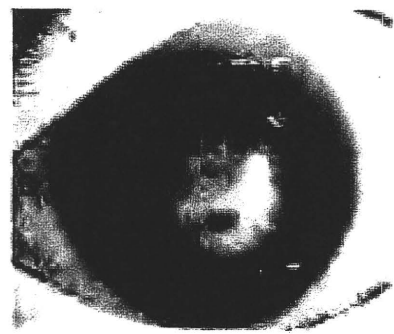


図22 角膜真菌性



視力が低下し、涙や目やにがかなりたくさん出ます。角膜に白いにじりがあるのが肉眼でわかることもしばしばあります。

細菌と違って、このような状態になるのに日数がかかるのが真菌の特徴で、いったん症状が確立するとなかなか治りにくくなります。

細菌性角膜炎と同様に、通常は片眼性です。

角膜の悪くなっている部分をこすり取って、それを顕微鏡で調べたり培養したりして、真菌が感染していることを確認します。

この方法は細菌の場合とよく似ているので、通常は細菌と真菌について同じ材料（極体）をもとにして調べるのが一般的です。

抗真菌薬の投与

抗真菌薬（カビに対する薬）の投与を行います。前記したように細菌の場合に比べて治療に時間がかかります。軽症と考えられた場合でも点眼、眼軟膏、内服、点滴を併用して治療するのが一般的です。多くは入院治療となります。

細菌性角膜炎と同様、異物で治らない場合や、強いにじりを残して治った場合は、角膜移植を行うこととなります。

原因の特定

異物、とくに植物性のものが飛入した時は要注意ですが、細菌と比べて症状の発生が遅いので、単なる異物であると軽視せず、眼科を受診する必要があります。

診断

細菌性角膜炎(40)、アカントアメーバ角膜炎(40)

原因は何か

アカントアメーバは通常なかなか感染を起こしませんが、多くはアメーバで汚染されたコンタクトレンズを使用することによって生じます。

症状の現れ方

非常にゆっくりと進行しますが、他の感染に比べて目の痛みが非常に強いのが特徴で、涙もかなり出ます。また、白目の充血も非常に強くなります。視力の低下は初期は軽度ですが、徐々に見にくくなり、進行すると重度の視力障害となります。

治療と診断

角膜の悪くなっている部分をこすり取って、アカントアメーバを陰出しますが、特殊な病原体であり、また、めずらしい病気であるだけに、大きな総合病院でも検査が困難なことが多い点が問題になっていきます。

薬の処方

アメーバに対する特効薬がないため、抗真菌薬を使用しますが、それに加えて感染した角膜表面を何度も削る治療を併用する必要があります。

根治には何か月もかかることがあります。

アカントアメーバ角膜炎

*Acanthamoeba keratitis*

井上幸次

原因の特定

アメーバの一種であるアカントアメーバが角膜に感染して起こる病気です。まれですが、角膜の感染症のなかでは最重症です。

角膜は非常に感染しにくい病原体であり、正しくコンタクトレンズを使用している場合に感染することはあまりありません。しかし、いったん感染すると、診断・治療は困難を極めます。この病気はそうならないように予防すべき病気といえます。

細菌性角膜炎(101)、角膜真菌症(102)、コンタクトレンズと眼感染(コラム10)

### 蚕蝕性角膜潰瘍

Randall's corneal ulcer

井上幸次

通常、角膜潰瘍は角膜の中央に起こることが多いのですが、この病変は角膜の周辺部に沿って円弧状に角膜が薄くなるものです。まれですが重症の角膜の病変です(図23)

角膜を自分の免疫が攻撃する自己免疫疾患のひとつと考えられています。やはり自己免疫疾患である関節リウマチの患者さんに、蚕蝕性角膜潰瘍と同じような状態が生じることがあります。

### 眼痛の訴え

白目のある部分の強い充血と眼痛を生じます。眼痛が強いとされていますが、ほとんど痛みを訴えない場合もみられます。目やにはあまり出ません。

角膜の中央は最初は侵されないのですが、視力はあまり低下しませんが、進行すると強度の乱視や角膜中央のはれを伴ってきて視力が低下します。また、薄くなるとところに孔があくこともあり、その場合は熱い涙が突然出て、視力が急に低下します。片眼のことも両眼のこともありえます。

### 他の自己免疫疾患

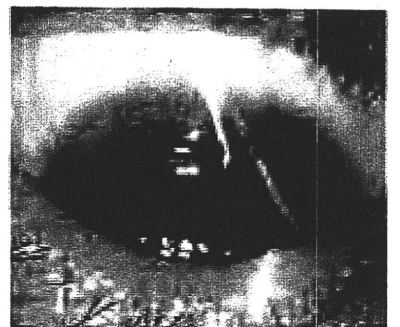
他の自己免疫疾患がないか血液検査を行います。通常の蚕蝕性角膜潰瘍はそれだけで発症し、他の自己免疫疾患を伴いませんが、もし他の自己免疫疾患が見れば、それに対する治療が必要になります。

関節リウマチで蚕蝕性角膜潰瘍と類似の状態になったものは、関節リウマチに伴う周辺部角膜潰瘍と考えられています。蚕蝕性角膜潰瘍とは別とされていますが、両者が本当に別の病変であるのかどうかは、実はよくわかっていません。

### この病変は

この病変は、自分の免疫反応が自分の

図23 蚕蝕性角膜潰瘍



スリットを当てることで角膜が薄くなっていることがわかる。

体を障害している状態なので、免疫反応を抑制するよう副腎皮質ステロイド薬を使用します。点眼では不十分なことが多く、内服などの全身投与を併用します。また多くの例で、治療用のソフトコンタクトレンズを装用します。免疫抑制薬を使用する場合もあります。

重症の場合は薬物療法では不十分で、外科的に角膜潰瘍を生じている部分の結膜を切除し、その部の黒目と白目の境界部に、ドナー(提供者)由来の角膜の表層断片を移植する角膜上皮形成術という特殊な手術を行います。

### 角膜潰瘍(101)

## 円錐角膜

Keratoconus

井上幸次

### どんな病氣か

角膜はドーム状をしています。中央が薄くなる病氣です。

多くは10代で発症し、以後少しずつ進行していきますが、30代以降は通常あまり大きく進行しません。左右差はありませんが、基本的に両眼性です。

### 原因は何か

原因はまだ十分に解明されていませんが、家族性の場合が少なからずあることから、遺伝的な因子が関与していることは確かです。

また、アトピー性皮膚炎を合併していることも多く、眼をこするといわれており、悪化の要因となつているといわれており、角膜が突出しやすい遺伝的素因に環境要因がプラスされて発症すると考えられています。

### 症状の現れ方

初期は遠方の視力低下があるものの、眼鏡で十分に視力が出るので、普通の近視や乱視の人とあまり変わりません。ところが突出が進行してくると、眼鏡では

無理で、ハードコンタクトレンズでないと視力矯正ができなくなつてきます。その後、さらに突出してくるとコンタクトレンズも装用できなくなり、強い視力低下を起こします。

また、その経過中で突然、角膜のいちばん奥に亀裂が生じ、そこから角膜内に大量の眼内液(房水)が流入して、角膜が著しくはれることがあります(急性水腫)。この時は、肉眼でも角膜の中央が白くにごつているのがわかるようになり、視力はさらに低下します。

### 検査と診断

進行したものは細隙灯顕微鏡検査でわかりますが、軽症の人では角膜の表面の形を解析するフォトケラトスコープやビデオケラトスコープという特殊な装置による検査が必要です。バキメーターという角膜の厚みを測る検査も診断に役立ちます。

### 治療の方法

軽症・中等症ではハードコンタクトレンズを装用することによって、ある程度の視力が得られます。また、ハードコンタクトレンズを装用することによって、円錐角膜の進行が少し抑制される効果もあります。

急性水腫が生じた時は、コンタクトレ

ンズは装用せず経過をみますが、非常に強いはれとにのりがあるにもかかわらず、だいたい1〜2カ月で軽快します。そのため、視力低下が強いからといって、この時期に角膜移植をする必要はありません。多くの例で、軽快後は再びコンタクトレンズが装用できるようになります。

コンタクトレンズをしてもすぐ脱落したり、異物感が強いなどトラブルが多くて装用が継続できない場合は、角膜移植を行うこととなります。円錐角膜は、角膜移植後の予後が最もよい角膜の病氣のひとつです。

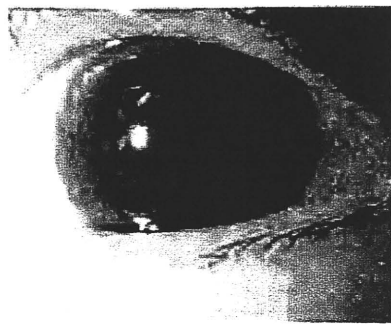
### 病氣に気づいたらどうする

最近では、軽度の円錐角膜の人が、近視などを手術で治す屈折矯正手術(レーザーで角膜を加工するレーシック手術など)を受けてしまう例があり、問題となつていきます。

現在の屈折矯正手術は、角膜を削ることによって行われているので、もともと角膜が薄く突出してきている円錐角膜では、この手術を受けるとますます進行してしまうことから、屈折矯正手術は禁忌とされています。

しかし、初期の円錐角膜と強い乱視の区別は難しいので、円錐角膜が疑われる場合は、現在の屈折矯正手術の方法によ

図24 顆粒状角膜ジストロフィ



るかぎり、この手術は見合わせるべきであるといえます。

## 角膜ジストロフィ

Corneal dystrophy

井上幸次

遺伝性の病気で、両眼の角膜実質にいろいろなものが沈着したり（顆粒状角膜ジストロフィ（図24）、格子状角膜ジストロフィ、斑状角膜ジストロフィ、膠様滴状角膜ジストロフィなど）、角膜の内側の内皮細胞が異常を来して角膜のはれを生じたり（フックス角膜内皮ジストロフィ）するため、視力に影響してきます。膠様滴状角膜ジストロフィは、欧米ではまれで日本人に多く、反対に、フックス角膜内皮ジストロフィは欧米に多く、

日本人には少ないのが特徴です。

### 原因は何が

原因は遺伝であり、最近、その多くについて原因となる遺伝子が解明されました。前にあげたなかでも、フックス角膜内皮ジストロフィを除いて、原因となる遺伝子が特定されています。

### 症状の現れ方

最も頻度が高い顆粒状角膜ジストロフィは、角膜の混濁が部分的であるため、軽度であればまったく無症状ですが、年齢とともに視力の低下やまぶしさを訴えるようになります。

格子状角膜ジストロフィは、それよりも視力低下が強く、また角膜の上皮の接着が不良なため、再発性角膜びらんを生じて眼痛を生じることがあります。

斑状角膜ジストロフィとフックス角膜内皮ジストロフィは、年齢とともに強い視力障害を生じてきます。

膠様滴状角膜ジストロフィは、かなり若いころから、アミロイドという物質が角膜の表面近くに沈着して表面がでこぼこになるため、視力障害やまぶしさが強いのが特徴で、再発性角膜びらんも生じます。

一部の専門病院では、血液から白血球

を採取し、そこに含まれているDNAを解析し、原因遺伝子を検索することがありますが、まだ一般的な検査とはなっていません。

### 治療の方法

原因の遺伝子は最近わかりましたが、まだそれによる原因治療は開発されていません。治療としては、エキシマレーザーというレーザーを使用して角膜の表面のにごりのあるところを削る方法や、角膜移植が選択されます。

角膜ジストロフィでのレーザーや角膜移植の成績は一般に良好ですが、原因が内因性であるため、このような治療を行っても再発してくる可能性があります。それが現在の課題となっています。

### 注意

角膜の構造と透明な理由（コラム138）、角膜びらん（139）

## 兔眼

Lagophthalmos

井上幸次

### どんな病気が

眼を閉じることができなくなり、そのため眼の表面が強度の乾燥状態となって、角膜に点状表層角膜症や角膜混濁を生じ

る病氣です

一般に眼を閉じようとすると眼は上を向くので、兎眼の時は角膜の下方が外気にさらされることになるため、傷は角膜の下方に強く出ます。極端な例では角膜潰瘍となったり、細菌や真菌の感染を伴う重症な例もあります。

**原因は顔面神経麻痺**

原因は顔面神経麻痺であり、脳梗塞や脳腫瘍の部分症として生じたり、ベル麻痺といつて原因不明（現在ではその多くにヘルペスウイルスが関与していると考えられています）の顔面神経麻痺が単独で生じたりします。

**眼が閉じられないため、眼の表面の強い乾き、こもつき、痛みを生じます。長期化すると、表面の傷が常態化するばかりか、角膜表面のにごりも伴って視力が低下します。**

顔面神経麻痺の原因を検索するため、頭部の断層写真（CTやMRI）をとります。

**顔面神経麻痺の原因治療を行うのはもちろんです。眼の治療については、顔面神経麻痺が軽快してくるまでの間、眼の**

表面が乾燥するのを防ぐため、軽症では防腐剤を含んでいない人工涙液を頻回に点眼したり、中等症では抗菌薬眼軟膏を入れて眼帯をします。重症になると、眼を閉じた上から透明な専用保護膜を貼ったり、上と下のまぶたを一時的に縫い合わせたりします。

かなり軽い兎眼でも、寝ている時は薄く眼をあいていることが多いので、夜寝る前にたっぷり眼軟膏を入れて、寝ている間に乾燥の影響が出ないようにしましょう。

**点状表面角膜症 (138)、ドライアイ (140)、顔面神経麻痺 (118)**

点状表面角膜症 (138)、ドライアイ (140)、顔面神経麻痺 (118)

**水疱性角膜症**

**水疱性角膜症**  
Bullous Keratopathy  
井上幸次

**どんな病氣か**

角膜が水ばれして光が通りにくくなるとともに、角膜表面（上皮）にも水がたまって水疱ができる病氣です（図25）。

**原因は何か**

角膜の内側に並んでいる内皮細胞の数が減って、角膜に入ってくる眼内の水

（房水）を眼内へもどすポンプのはたらきが低下するのが原因です。角膜の内皮細胞は、生まれながら死ぬまで増えることはないのです。遺伝的に内皮細胞が弱かったり（フックス角膜内皮ジストロフィなど）、外的な原因で内皮細胞が障害されたり（外傷、角膜感染、白内障手術、緑内障に対するレーザー治療など）した結果生じます。

**視力の低下**

視力が低下するのはもちろんですが、表面の水疱のために、眼の痛みも伴ってきます。原因によって、両眼性であったり片眼性であったりします。

**検査と診断**

角膜内皮細胞はそのまま拡大写真が撮影でき、細胞の密度を算定することができます。それによって内皮細胞が少なく、水疱性角膜症になりやすいかどうかを判

図25 水疱性角膜症



定します。ただ、水疱性角膜症になってしまふと内皮細胞は撮影できなくなりま

**治療法**

非常に初期には、濃度の濃い生理食塩水の点眼や眼軟膏で角膜中の水分を吸い取ることによって、少し視力がよくなりますが、根本的な治療としては、どうしても角膜移植が必要になります。最近では角膜の内皮側だけを入れかえる方法も行われるようになってい

**原因**

角膜の構造と透明な理由（コラム138）、角膜ジストロフィー（140）

**角膜化学腐蝕**

Chemical cauterization of cornea

井上幸次

酸やアルカリが眼に入ると、角膜がた

**原因**

だれる病氣です。 仕事上の事故で眼に入ることが多く、男性に多いのが特徴です。酸よりアルカリのほうが重症で、とくに水酸化ナトリウム（苛性ソーダ）は非常に状態が悪くなります。また、熱いアルカリや酸が飛

入した時は角膜のやけど（熱傷）も伴うため、よりいっそう状態は悪くなります。

**症状の現れ方**

酸やアルカリが入ると強い充血・痛みを伴って眼が見えなくなり、自分で眼をあけるのもつらい状態になります。

ひどい場合は角膜の強い混濁が残り、まぶたの側と眼球の側がくっついてしまふような場合もあります。さらにひどくなると、角膜潰瘍から角膜穿孔（孔がある）を生じて、失明に至るケースもあります。

**検査と診断**

詳しい検査をするまでもなく、状況から化学腐蝕であることは明らかなので、応急処置を優先します。

涙のpH（通常は中性）をpH試験紙で測って、どの程度、酸性・アルカリ性に傾いているかを判定し、治療や予後判定の参考にします。

**治す方法**

まず、アルカリや酸を洗い流すことが重要なので、大量の生理食塩水でとにかく洗眼します。

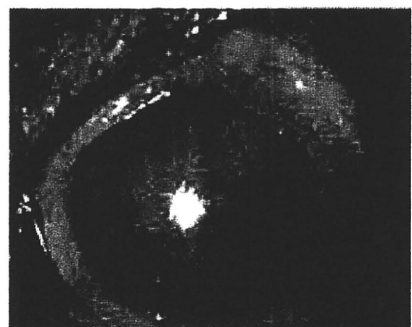
セメントのような固形のものが眼の表面にはりついている場合（図26）は（この固形物が涙に溶けてアルカリが放出され、慢性的に眼表面が障害される）、

洗っても取れないため、手術で摘除します。その後は、炎症を抑制するため副腎皮質ステロイド薬の点眼・内服と、感染予防のため抗菌薬点眼を行い、眼帯や治療用ソフトコンタクトレンズで眼の表面を保護します。

**重症に陥ついたらどうする**

これらの薬物治療で、初期の炎症が落ちついたあとも強いにこりやはれが残った場合は、角膜移植を行うこととなります。しかし、重症度にもよりますが、角膜移植の成績は必ずしもよくありません。 アルカリや酸が飛入した時点で、すぐに自分で大量の流水で洗い流すことが極めて重要です。これをするかしないかで、あとの経過に大きな違いが出てきます。 また、入ったものの性質が重要なので、その成分がわかるようなものを眼科に持

図26 セメントによる角膜化学腐蝕



参して医師に見せてください。治療や予後判定のうえで非常に役立ちます。

この病氣で最も大切なことは、酸やアルカリが眼に入る可能性のある危険な作業にあたっては、ゴーグルなどの眼を守る手段をとって予防することです。

**関連項目**

角膜潰瘍 (140)

**強膜炎、上強膜炎**

Scleritis, Episcleritis

井上幸次

**どんな病氣か**

白目の部分の眼球壁は、強膜という組織です。つまり、眼球の外壁のいちばん前の5分の1だけが透明で、この部分が角膜ですが、後ろ5分の4は白い不透明な強膜という組織となっているわけです。ちなみに、角膜の周囲の強膜の上には半透明の結膜が張っています(図17・1398)。この強膜あるいはその表面に炎症を起こした状態が強膜炎、上強膜炎です。

**原因は何が**

生体を防御する免疫反応が自己組織を攻撃する自己免疫疾患や、さまざまな全身性の炎症性疾患(梅毒、結核、サルコイドーシス、痛風など)、局所の感染

(これは極めてまれ)などが原因としてあげられています。多くは原因不明で、眼の病氣のなかで最もその実態がわかっていない病氣のひとつです。

**症状の現れ方**

片眼の場合も両眼の場合もあります。充血が強いですが、上強膜炎ではそれ以外の症状は軽度です。強膜炎ではさらに強い充血を示し、痛みも強く、また範囲が広く眼の後ろの強膜も侵されている(後部強膜炎)と視力もかなり低下します。

強膜が溶ける例(壊死性強膜炎)では、その部分の強膜が薄くなつて、なかのぶどう膜という濃い茶色の部分が透けて見えるようになるため、白目に黒いところが出てきたように見えます。

**検査と診断**

検査しにくいのがこの病氣の特徴ですが、原因を検索するために血液検査や胸部X線検査を行います。また、局所の感染が疑われる場合は炎症を起こしている部分や涙のなかに細菌や真菌、ヘルペスウイルスなどがいないかどうか検査する場合があります。

眼の後ろのほうまで炎症が広がっていることが疑われる場合は、眼の超音波断層撮影を行って奥の強膜がはれていない

か、また眼底検査を行って網膜組織を伴っていないかを調べます。

**治療の方法**

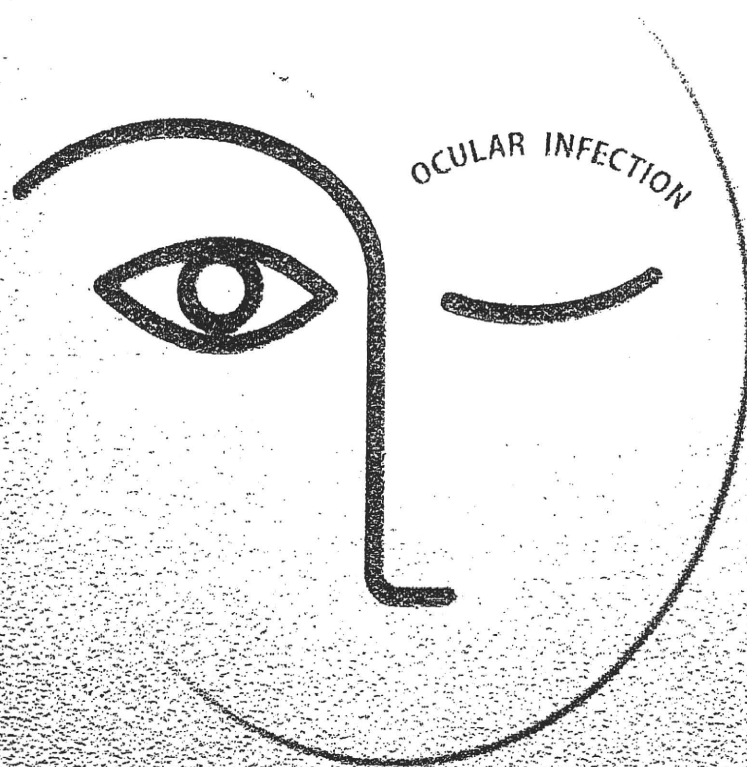
局所の感染による場合は、その原因微生物に対する薬物を投与します。局所の感染でない場合は、副腎皮質ステロイド薬を重症度に応じて投与します。

上強膜炎の場合は点眼で比較的容易に軽快しますが、強膜炎の場合は多くは全身投与が必要です。もちろん、原因となる病氣が判明した場合は、その病氣に対する治療を並行して行います。

# 眼の感染症

下村 嘉一 編集

近畿大学 教授





# 1 角膜の感染防御機構

角膜は一旦感染が生じると、たとえ治癒しても瘢痕を生じて視機能に重大な障害をきたす。しかも体表面にあつて、かつ無血管組織であることから、最も感染に対して無防備であるようにみえる。しかし、実はそれゆえに、角膜を守るために十重二十重の工夫がこらされている。本項ではその一部を紹介したい。

## 眼の構造

そもそも眼の眼窩骨が飛び出ていることが、外界からの異物飛入を妨げるようになっており、広い意味での感染防御に役立っているといえる。また、睫毛も同様に異物飛入を妨げている。

## 涙液

涙液が分泌され、瞬目が生じることによって、常に眼表面には新しい涙液が供給され、洗い流される状態になっており、この物理的な機構が感染防御に役立っている。そのため、顔面神経麻痺などで兔眼となった時は、この機構が障害されて感染が生じやすくなるのである。また、涙点プラグを装用した患者で角膜感染が生じる例があるのも、涙点プラグがこの涙液の交換を妨げることが関与している。

涙液中には感染防御に働く種々の物質が含まれている<sup>1</sup>。代表的なものとして IgA、IgG、補体 (complement)、ラクトフェリン (lactoferrin)、リゾチーム (lysozyme)、 $\beta$ -lysin、デフェンシン (defensin)、secretory phospholipase A<sub>2</sub>、surfactant protein D などが知られている。

IgA は涙液中に認められる代表的な免疫グロブリンである<sup>2</sup>。涙腺の形質細胞において J 鎖でつながった二量体として産生され、管腔上皮細胞で産生された secretory component と結合して分布される。量的には IgE の方が多いが、IgE はアレルギーに主に関与しており、感染防御については IgA が重要で、細菌の接着をブロックする。また、ウイルスに対しても有効であり、たとえば涙液には herpes simplex virus (HSV) に対する中和活性があるが、それは主として IgA に由来している。

IgG は補体とともに微生物の破壊と好中球などによる貪食を促進する。補体には classical pathway と alternative pathway の 2 つが知られているが、classical pathway は IgG の抗原抗体複合物によって C1、C4、C2 を経て C3 が、alternative pathway はそれらを介することなく直接細菌や真菌のリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) や内毒素 (endotoxin) によって C3 が活性化される。C3 の活性化は貪食を促進するとともに、その後 C5、C6、C7、C8、C9 の順に活性化されて酵素的に微生物を破壊できるようになる。涙液には classical pathway、alternative pathway を構成するすべての補体が含まれている。

ラクトフェリンはもともと乳汁から見つかったことから「ラクト」とついているが、涙液にも多く含まれており、「フェリン」とあるように細菌の増殖に必要な鉄分をキレートすることによって、細菌の増殖を抑制する。また、HSV などに対する抗ウイルス効果も報告されている。

リゾチームは涙液の蛋白成分の 30% を占めており、細菌の細胞壁をこわす働きがある。また、 $\beta$ -lysin には細胞膜をこわす働きがある<sup>1</sup>。

デフェンシンは antimicrobial peptide (AMP) という生体が産生する抗菌力をもった 50 個以下のアミノ酸からなる小ペプチドの 1 種類であり、涙液には主として  $\alpha$ -defensin (human neutrophil peptide ; HNP) 1, 2, 3 が認められる<sup>1</sup>。これらの  $\alpha$ -defensin は正常涙液に恒常的に認められとともに、感染その他の刺激によって増加する。たとえば、翼状片手術後に  $\alpha$ -defensin 1, 2, 3 が増加することが報告されている。

secretory phospholipase A<sub>2</sub> はグラム陽性球菌を殺菌することができ、涙液のブドウ球菌に対する抗菌力の主力となっている<sup>4</sup>。また、緑膿菌に対する涙液の抗菌力の主力として collectin family に属する surfactant protein D が注目されている<sup>5</sup>。

## 結 膜

結膜には豊富に血管とリンパ管が分布しており、また CALT (conjunctiva-associated lymphoid tissue) が分布しており、外界からの微生物を含めた異物に対して敏感に反応できる。リンパ球としては B 細胞や形質細胞は少なく T 細胞が多いのが特徴である<sup>6</sup>。それと比較して涙腺では形質細胞が多く、IgA を多く産生する原動力となっている。結膜には抗原を捕捉するため抗原提示細胞である Langerhans 細胞や樹状細胞も豊富に分布している。

結膜には常在菌として表皮ブドウ球菌、コリネバクテリウム、アクネ菌などが分布しているが、これらの細菌がコロニーを形成していることが病原性の強い細菌の増殖を抑制していると考えられている。たとえば表皮ブドウ球菌のコロニーが多いと黄色ブドウ球菌のコロニーはできにくく、逆にアトピー性皮膚炎患者では結膜から高率に黄色ブドウ球菌が分離されるが、表皮ブドウ球菌は逆に少ない。

## 角 膜

### ① 細 胞

角膜感染の最大のブロックとなっているのが角膜上皮そのものである。角膜上皮が正常な場合は滅多に感染を生じない。逆にこれが障害される外傷・コンタクトレンズ装用・糖尿病などでは、角膜感染が生じやすくなる。黄色ブドウ球菌や肺炎球菌などの重症の結膜炎を生じた患者が滅多に角膜感染を生じないのは、この角膜上皮のブロックによるところが大きい。ただし、淋菌だけは正常の角膜上皮を突破して、結膜炎から角膜潰瘍、さらには角膜穿孔に至ることがある。

かつては角膜には抗原提示能力のある細胞が分布しておらず、感染などの刺激があれ

ば輪部に分布している Langerhans 細胞が角膜上に侵入してきてその役割を果たすといわれていたが、最近の研究では Langerhans 細胞が入ってくるのはその通りだが、それ以外に抗原提示能力のある細胞が角膜内に潜在していることが明らかにされている。たとえば角膜実質の浅層に CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHC class II<sup>-</sup>細胞（未成熟な樹状細胞）が、深層には CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>MHC class II<sup>-</sup>細胞（マクロファージ）が分布していることがマウス角膜で確かめられ、刺激があるとこれらの細胞が MHC class II を表現して抗原提示細胞として働くようになるということがわかってきた<sup>7)</sup>。また、角膜実質細胞には貪食能力や抗原提示能力がそなわっており、たとえばウサギ角膜にウシ血清アルブミンを打つと抗原抗体複合物を角膜実質細胞が処理してきれいな免疫輪が形成されることが確かめられている。

中央の角膜内には通常の免疫担当細胞は認められないが、周辺部角膜には好中球、好酸球、リンパ球、形質細胞、肥満細胞が分布しており、感染を生じた場合は前述の Langerhans 細胞同様に中央へ向かって移動して感染防御に働く。

## ② 分子

角膜の細胞は上皮細胞を中心として感染防御に関わる種々の分子を産生する。

中でも微生物に対する innate immunity（先天免疫）において、微生物を認識する受容体として働く Toll-like receptor (TLR) は重要である (TLR についての詳細については別項参照)。TLR がないと角膜感染にいろいろな影響が出る。たとえば TLR4 がいないマウスでは緑膿菌に感染しやすくなる。また、TLR9 がいないマウスでは HSV 角膜炎が非常に重症になる。しかし、TLR の角膜における表現は単純ではなく TLR2, 4 の蛋白は角膜上皮細胞に表現されているが、細胞表面には出ておらず、LPS やプロテオグリカンに対して反応が起こらない。また TLR5 の蛋白は角膜上皮に表現されているが、その分布は基底細胞と翼細胞に限られており表層細胞には表現されていない。このように感染防御にいち早く働く分子をもちながら、それがただちに反応できない状態になっていることは不思議であるが、眼表面には常に常在細菌がいるので、それらに常に反応する状態ではかえって困ることになる。これは、過剰な反応を起こさないようにするための生体の賢い方法なのかもしれない<sup>8)</sup>。

抗ウイルス効果のあるインターフェロンは角膜上皮からも産生される。たとえば 2 本鎖 RNA が TLR3 に反応すると、末梢血単核球よりも多いレベルでインターフェロン  $\beta$  が産生される

角膜の細胞はサイトカインも産生する。IL-1, IL-6, IL-8 など多くのサイトカインが角膜から検出される<sup>9)</sup>が、これらのサイトカインの多くは感染に伴ってその量が著明に増大する。たとえば、角膜上皮細胞は緑膿菌の鞭毛を構成するフラジェリン (flagellin) という蛋白に反応して IL-6 や IL-8 を産生する。

AMP としては human  $\beta$ -defensin (hBD) や LL-37 (HCAP18) などが角結膜上皮細胞から産生されている<sup>3)</sup>。LL-37 は cathelicidin の一種であり、細菌の LPS に付いてこれを中和する働きがある。これらの AMP は感染の刺激があればその産生が増加する。たとえば黄色ブドウ球菌によってヒト培養角膜上皮細胞から  $\beta$ -defensin2 が産生され、これ

がTLR2の抗体で抑制されることが報告されている。

角膜上皮の細胞膜には膜貫通型ムチンがあるが、その一つであるMUC16が黄色ブドウ球菌の角膜上皮への接着を阻害することが報告されている<sup>10)</sup>。

MHC (major histocompatibility complex) 抗原は獲得免疫において非常に重要だが、class I 抗原は上皮、実質、内皮のすべてに表現されている。class II 抗原は正常角膜ではLangerhans 細胞、血管細胞、一部の实質細胞に表現されているが、刺激があれば誘導される。たとえばインターフェロン $\gamma$ によって角膜上皮、実質、内皮細胞においてclass II 抗原が表現されるようになる<sup>9)</sup>。

それ以外にも、IgG、補体、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) (角膜実質、上皮に表現) などの接着分子<sup>9)</sup>、Fc receptor (角膜上皮に表現)、DAF (decay accelerating factor; CD55) などの complement regulatory proteins (角膜上皮、実質に表現) など、感染防御に関わる種々の分子が角膜には表現され、角膜を透明に保つことに寄与している。

## おわりに

以上のように角膜には複雑な感染防御機構が備わっている。これは感染を防御することはもちろん重要だが、角膜で過剰な防衛が起こると視機能に重大な障害が生じるので、それについても日配りをしなければならぬことを反映していると考えられる。その意味で前房に入った抗原に対する遅延型過敏反応が抑制される ACAID (anterior chamber associated immune deviation) とその意味合いが似ているところがある。我々は角膜感染の治療・予防にあたって、この生体のもっている感染防御機構を十分理解して、これを妨げずに、うまく利用することを考えていくことが必要であろう。

## ▶ 文献

- 1) Mannis MJ, et al: Natural defense mechanism of the ocular surface. Pepose JS, et al: Ocular Infection & Immunity. Mosby, pp185-190, 1996.
- 2) Allansmith MR: Defense of the ocular surface. Int Ophthalmol Clin 12, 93-109, 1978.
- 3) McDermott AM: The role of antimicrobial peptides at the ocular surface. Ophthalmic Res 41: 60-75, 2009.
- 4) Qu X-D, et al: Secretory phospholipase A<sub>2</sub> is the principal bactericide for staphylococci and other gram-positive bacteria in human tears. Infect and Immun 66: 2791-2797, 1998.
- 5) Ni M, et al: Surfactant protein D is present in human tear fluid and the cornea and inhibits epithelial cell invasion by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect and Immun 73: 2147-2156, 2005.
- 6) Sacks EH, et al: Lymphocytic subpopulations in the normal human conjunctiva. A monoclonal antibody study. Ophthalmology 93: 1276-1283, 1986.
- 7) Hamrah P, et al: The corneal stroma is endowed with a significant number of resident dendritic cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 581-589, 2003.
- 8) Ueta M, et al: Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. J Immunol 173: 3337-3347, 2004.
- 9) Williams JM, et al: Corneal responses to infection, Krachmer JH, et al: Cornea Fundamentals of Cornea and External Disease. Mosby, pp129-145, 1997.
- 10) Blalock TD, et al: Functions of MUC16 in corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 48: 4509-4518, 2007.

井上幸次

# Metabolome Analysis Revealed Increase in *S*-Methylcysteine and Phosphatidylisopropanolamine Synthesis upon L-Cysteine Deprivation in the Anaerobic Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*<sup>\*[5]</sup>

Received for publication, July 22, 2010, and in revised form, September 23, 2010. Published, JBC Papers in Press, October 5, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.167304

Afzal Husain<sup>†§1</sup>, Dan Sato<sup>1</sup>, Ghulam Jeelani<sup>‡||2</sup>, Fumika Mi-ichi<sup>†‡3</sup>, Vahab Ali<sup>§4</sup>, Makoto Suematsu<sup>||</sup>, Tomoyoshi Soga<sup>1</sup>, and Tomoyoshi Nozaki<sup>†‡,5</sup>

From the <sup>†</sup>Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan, the <sup>§</sup>Department of Parasitology, Gunma University, Graduate School of Medicine, Maebashi 371-8511, Japan, the <sup>||</sup>Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, Japan, and the <sup>||</sup>Department of Biochemistry and Integrative Medical Biology, School of Medicine, Keio University, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan

L-Cysteine is ubiquitous in all living organisms and is involved in a variety of functions, including the synthesis of iron-sulfur clusters and glutathione and the regulation of the structure, stability, and catalysis of proteins. In the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, the causative agent of amebiasis, L-cysteine plays an essential role in proliferation, adherence, and defense against oxidative stress; however, the essentiality of this amino acid in the pathways it regulates is not well understood. In the present study, we applied capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry to quantitate charged metabolites modulated in response to L-cysteine deprivation in *E. histolytica*, which was selected as a model for examining the biological roles of L-cysteine. L-Cysteine deprivation had profound effects on glycolysis, amino acid, and phospholipid metabolism, with sharp decreases in the levels of L-cysteine, L-cystine, and *S*-adenosylmethionine and a dramatic accumulation of *O*-acetylserine and *S*-methylcysteine. We further demonstrated that *S*-methylcysteine is synthesized from methanethiol and *O*-acetylserine by cysteine synthase, which was previously considered to be involved in sulfur-assimilatory L-cysteine biosynthesis. In addition, L-cysteine depletion repressed glycolysis and energy generation, as it reduced acetyl-CoA, ethanol, and the major nucleotide di- and triphosphates,

and led to the accumulation of glycolytic intermediates. Interestingly, L-cysteine depletion increased the synthesis of isopropanolamine and phosphatidylisopropanolamine, and it was confirmed that their increment was not a result of oxidative stress but was a specific response to L-cysteine depletion. We also identified a pathway in which isopropanolamine is synthesized from methylglyoxal via aminoacetone. To date, this study represents the first case where L-cysteine deprivation leads to drastic changes in core metabolic pathways, including energy, amino acid, and phospholipid metabolism.

Sulfur-containing amino acids are essential for all living organisms from bacteria to higher eukaryotes and play indispensable roles in various cellular processes, such as methylation and the generation of polyamines, iron-sulfur clusters, and antioxidants. L-Cysteine in particular is essential for the structure, stability, and various protein functions, including catalysis, electron transfer, redox regulation, nitrogen fixation, and sensing for regulatory processes (1).

*Entamoeba histolytica* is an enteric protozoan parasite that causes hemorrhagic dysentery and extraintestinal abscesses in millions of inhabitants of endemic areas (2). This parasite is generally considered as anaerobic/microaerophilic and has been shown to consume oxygen and tolerate low levels of oxygen pressure but lacks most of the components of antioxidant defense mechanisms, such as catalase, peroxidase, glutathione, and the glutathione-recycling enzymes glutathione peroxidase and glutathione reductase (3, 4). L-Cysteine, which replaces glutathione as a major thiol in *E. histolytica*, is synthesized via a sulfur assimilatory *de novo* cysteine biosynthetic pathway (5–9) that is typically present in bacteria and plants. This pathway consists of two steps that are catalyzed by serine acetyltransferase (SAT, EC 2.3.1.30)<sup>6</sup>

\* This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research 18GS0314, 18050006, and 18073001 (to T. N.) and 20590429 (to D. S.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, Grant H20-Shinkosaiko-016 for research on emerging and re-emerging infectious diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, and a grant for research to promote the development of anti-AIDS pharmaceuticals from the Japan Health Sciences Foundation (to T. N.).

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. S1.

<sup>1</sup> Supported by the Monbukagakusho Scholarship from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

<sup>2</sup> Supported by the Global Center of Excellence Program for Human Metabolomic System Biology of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

<sup>3</sup> Present address: Division of Molecular and Cellular Immunoscience, Dept. of Biomolecular Sciences, Saga University, Saga 849-8581, Japan.

<sup>4</sup> Present address: Dept. of Biochemistry, Rajendra Memorial Research Institute of Medical Sciences, Agamkuan, Patna-800007, India.

<sup>5</sup> To whom correspondence should be addressed: Dept. of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan. Tel.: 81-3-5285-1111, Ext. 2600; Fax: 81-3-5285-1219; E-mail: nozaki@nih.go.jp.

<sup>6</sup> The abbreviations used are: SAT, serine acetyltransferase; CS, cysteine synthase; CE-TOFMS, capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry; 2',7'-DCF-DA, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein di-acetate; ESI, electrospray ionization; Cho, choline; Cho-P, choline phosphate; OAS, *O*-acetylserine; SMC, *S*-methylcysteine; SAM, *S*-adenosylmethionine; Ispn, isopropanolamine; Ispn-P, isopropanolamine phosphate; Ptdlspn, phosphatidylisopropanolamine; Etn, ethanolamine; Etn-P, ethanolamine phosphate; PtdEtn, phosphatidylethanolamine.

## Response of *E. histolytica* to L-Cysteine Depletion

(7, 8) and cysteine synthase (CS; OAS (thiol) lyase; EC 4.2.99.8) (5). In addition to the presence of prokaryotic/plant-like L-cysteine biosynthesis, *E. histolytica* is also unique because the forward and reverse trans-sulfuration pathways are absent and interrupted, respectively. Furthermore, through lateral gene transfer from archaea, *E. histolytica* has acquired methionine  $\gamma$ -lyase (EC 4.4.1.11), an enzyme that degrades L-methionine, L-homocysteine, and L-cysteine (10–12). Thus, although typical parasitic protists show degenerated amino acid metabolic pathways, particularly those associated with catabolism, because of the parasitic lifestyle, sulfur-containing amino acid metabolism appears to have uniquely evolved in *E. histolytica*. However, the specific role of this pathway in this organism remains unclear.

L-Cysteine is the principal low molecular weight thiol in *E. histolytica* and is involved in the survival, growth, attachment, elongation, motility, gene regulation, and antioxidative stress defense of this organism (13–17). Because sulfur-containing amino acid metabolism differs significantly between *E. histolytica* and its mammalian host, the molecular dissection and characterization of this pathway may lead to the development of new chemotherapeutics against this parasite (18).

Here, to gain further insight into the roles and regulatory mechanisms of sulfur-containing amino acid metabolism and individual metabolites in *E. histolytica*, we utilized capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) (19–21) for the metabolomic profiling of this parasite. We observed drastic changes in the metabolome as a result of L-cysteine depletion, which led to the discovery of novel L-cysteine-mediated regulation of several metabolic pathways in *E. histolytica*.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals and Reagents**—All of the chemicals of analytical grade were purchased from either Wako or Sigma-Aldrich unless otherwise mentioned. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein di-acetate (2',7'-DCF-DA) was purchased from Invitrogen. L-Aminoacetone hydrochloride was obtained from United States Biologicals. High performance thin layer chromatography silica gel 60 plates were purchased from Merck. [ $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}$ ]L-Methionine and [ $^{13}\text{C}_3$ ,  $^{15}\text{N}$ ]L-serine were purchased from Cambridge Isotope Laboratories. Stock solutions of metabolite standards (1–100 mmol/liter) for CE-MS analysis were prepared in either Milli-Q water, 0.1 mol/liter HCl, or 0.1 mol/liter NaOH. A mixed solution of the standards was prepared by diluting stock solutions with Milli-Q water immediately before CE-TOFMS analysis.

**Microorganisms and Cultivation**—Trophozoites of the *E. histolytica* clonal strain HM-1: IMSS cl 6 were maintained axenically in Diamond's BI-S-33 medium at 35.5 °C, as described previously (22, 23). Trophozoites were harvested in the late logarithmic growth phase 2–3 days after the inoculation of medium with one-thirtieth to one-twelfth of the total culture volume.

**Metabolic Labeling and Metabolite Extraction**—*E. histolytica* trophozoites were cultivated in either standard BI-S-33 medium containing 8 mM L-cysteine or L-cysteine-deprived medium for 48 h. For the metabolic labeling, trophozoites were cultured in the presence of either 3 mM stable isotope-

labeled [ $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{15}\text{N}$ ]L-methionine or 6 mM [ $^{13}\text{C}_3$ ,  $^{15}\text{N}$ ]L-serine in L-cysteine-deprived medium for 48 h as described above. To extract metabolites,  $\sim 1.5 \times 10^6$  cells from each condition were harvested and washed twice with 5% mannitol. The cells were then suspended in 1.6 ml of methanol containing 16  $\mu\text{M}$  of each internal standard, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, methionine sulfone, and D-camphor-10-sulfonic acid and mixed with 1.6 ml of chloroform and 640  $\mu\text{l}$  of deionized water. After vortexing, the mixture was centrifuged at  $4,600 \times g$  at 4 °C for 5 min. The aqueous layer (1.6 ml) was filtrated using an Amicon Ultrafree-MC ultrafilter (Millipore Co.) and centrifuged at  $9,100 \times g$  at 4 °C for  $\sim 2$  h. The filtrate was dried and preserved at  $-80$  °C until mass spectrometric analysis (24). Prior to the analysis, the sample was dissolved in 20  $\mu\text{l}$  of deionized water containing reference compounds (200  $\mu\text{mol/liter}$  each of 3-aminopyrrolidine and trimesic acid).

**Instrumentation and CE-TOFMS Conditions**—CE-TOFMS was performed using an Agilent CE capillary electrophoresis system equipped with an Agilent 6210 time-of-flight mass spectrometer, Agilent 1100 isocratic HPLC pump, Agilent G1603A CE-MS adapter kit, and Agilent G1607A CE-ESI-MS sprayer kit (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The system was controlled by Agilent G2201AA ChemStation software for CE. Data acquisition was performed by Analyst QS software for Agilent TOF (Applied Biosystems and MDS Sciex).

**CE-TOFMS Conditions for Cationic Metabolite Analysis**—Cationic metabolites were separated in a fused silica capillary (50- $\mu\text{m}$  inner diameter  $\times$  100-cm) filled with 1 mol/liter formic acid as the reference electrolyte (25). Sample solution ( $\sim 3$  nl) was injected at 50 mbar for 3 s, and a positive voltage of 30 kV was applied. The capillary and sample trays were maintained at 20 °C and below 5 °C, respectively. Sheath liquid composed of methanol/water (50% v/v) that contained 0.1  $\mu\text{mol/liter}$  hexakis (2,2-difluoroethoxy)phosphazene was delivered at 10  $\mu\text{l/min}$ . ESI-TOFMS was operated in the positive ion mode. The capillary voltage was set at 4 kV, and a flow rate of nitrogen gas (heater temperature, 300 °C) was set at 10 p.s.i. For TOFMS, the fragmenter voltage, skimmer voltage, and octapole radio frequency voltage (Oct RFV) were set at 75, 50, and 125 V, respectively. An automatic recalibration function was performed using two reference masses of reference standards; protonated [ $^{13}\text{C}$ ]methanol dimer ( $m/z$  66.063061) and protonated hexakis (2,2-difluoroethoxy)phosphazene ( $m/z$  622.028963), which provided the lock mass for exact mass measurements. Exact mass data were acquired at the rate of 1.5 cycles/s over a 50–1,000  $m/z$  range.

**CE-TOFMS Conditions for Anionic Metabolite Analysis**—Anionic metabolites were separated in a cationic polymer-coated COSMO(+) capillary (50- $\mu\text{m}$  inner diameter  $\times$  110-cm) (Nacal Tesque) filled with 50 mmol/liter ammonium acetate solution, pH 8.5, as the reference electrolyte (26, 27). Sample solution ( $\sim 30$  nl) was injected at 50 mbar for 30 s, and a negative voltage of  $-30$  kV was applied. Ammonium acetate (5 mmol/liter) in methanol/water (50% v/v) that contained 0.1  $\mu\text{mol/liter}$  hexakis (2,2-difluoroethoxy)phosphazene was delivered as sheath liquid at 10  $\mu\text{l/min}$ . ESI-TOFMS was operated

## Response of *E. histolytica* to L-Cysteine Depletion

in the negative ion mode. The capillary voltage was set at 3.5 kV. For TOFMS, the fragmenter voltage, skimmer voltage, and Oct RFV were set at 100, 50, and 200 V, respectively (27). An automatic recalibration function was performed using two reference masses of reference standards: deprotonated  $^{13}\text{C}$  acetate dimer ( $m/z$  120.038339) and acetate adduct of hexakis (2,2-difluorothoxy)phosphazene ( $m/z$  680.035541). The other conditions were identical to those used for the cationic metabolite analysis.

**CE-TOFMS Data Processing**—Raw data were processed using the in-house software Masterhands (28). The overall data processing flow consisted of the following steps: noise filtering, baseline removal, migration time correction, peak detection, and integration of peak area from a 0.02  $m/z$ -wide slice of the electropherograms. This process resembled the strategies employed in widely used data processing software for LC-MS and GC-MS data analysis, such as MassHunter (Agilent Technologies) and XCMS (29). Subsequently, accurate  $m/z$  values for each peak were calculated by Gaussian curve fitting in the  $m/z$  domain, and migration times were normalized using alignment algorithms based on dynamic programming (19, 30). All of the target metabolites were identified by matching their  $m/z$  values and normalized migration times with those of standard compounds in the in-house library.

**Quantitation of Reactive Oxygen Species**—Fluorescence spectrophotometry was used to measure the production of intracellular reactive oxygen species using 2',7'-DCF-DA as a probe as previously described (31). Briefly, *E. histolytica* cells were washed in PBS, and  $5.0 \times 10^5$  cells were then incubated in 1 ml of PBS containing  $20 \mu\text{M}$  2',7'-DCF-DA for 30 min at  $35.5^\circ\text{C}$  in the dark. The intensity of fluorescence was immediately read at excitation and emission wavelengths of 492 and 519 nm, respectively.

**L-Cysteine/SMC Synthase Assay**—L-Cysteine/SMC synthase was assayed by measuring acetate production through the coupling reaction of this enzyme with acetate kinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase. Acetate kinase generates ADP and acetyl-phosphate from acetate and ATP. The ADP production was coupled with the oxidation of NADH ( $\epsilon_{340} = 6.22 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) through pyruvate kinase and lactate dehydrogenase (32). The standard reaction mixture contained 50 mM of Tris-Cl, pH 8.0, 3 mM OAS, 3 mM sodium sulfide or sodium methanethiolate, 4 units each of acetate kinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase, 0.5 mM ATP, 0.3 mM NADH, and 1–2  $\mu\text{g}$  of recombinant cysteine synthase. The reactions were initiated by the addition of recombinant cysteine synthase, and optical absorbance was read at 340 nm on a Shimadzu spectrophotometer. Kinetic parameters were determined using various concentrations (0.1–6 mM) of sodium sulfide, sodium methanethiolate, and OAS. The kinetic parameters were estimated using the nonlinear regression function obtained from the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

**Choline and Ethanol Quantitation**—The amount of choline (Cho) in the metabolite extracts was quantitated enzymatically using components of the Amplex<sup>®</sup> Red sphingomyelinase assay kit (Invitrogen). Briefly, Cho was first oxidized by

Cho oxidase to betaine and hydrogen peroxide. The produced hydrogen peroxide was then reacted with Amplex<sup>®</sup> Red reagent in a 1:1 stoichiometry in the presence of horseradish peroxidase to generate the highly fluorescent product resorufin, which was read in a fluorescence spectrophotometer (model F-2500; Hitachi) at excitation and emission wavelengths of 545 and 590 nm, respectively. Ethanol production by trophozoites cultured in either normal or L-cysteine-deprived medium was determined as described previously (33).

**Extraction of Lipids, Thin Layer Chromatography, and Phospholipid Quantitation**—Cells cultured in either normal or cysteine-deprived medium for 48 h were collected by centrifugation, and lipids were then extracted by the Bligh and Dyer's method (34). The extracted lipids were analyzed by two-dimensional high performance thin layer chromatography using a solvent system of chloroform:methanol:28% ammonium hydroxide (65:25:5 v/v/v) in the first direction and chloroform:acetone:methanol:Acetic acid:water (50:20:10:10:5 v/v/v/v/v) in the second. The phosphorus content of phospholipids was determined after scraping representative spots from the plate, as described previously (35). The lipids were visualized by exposing TLC plates to iodine vapor.

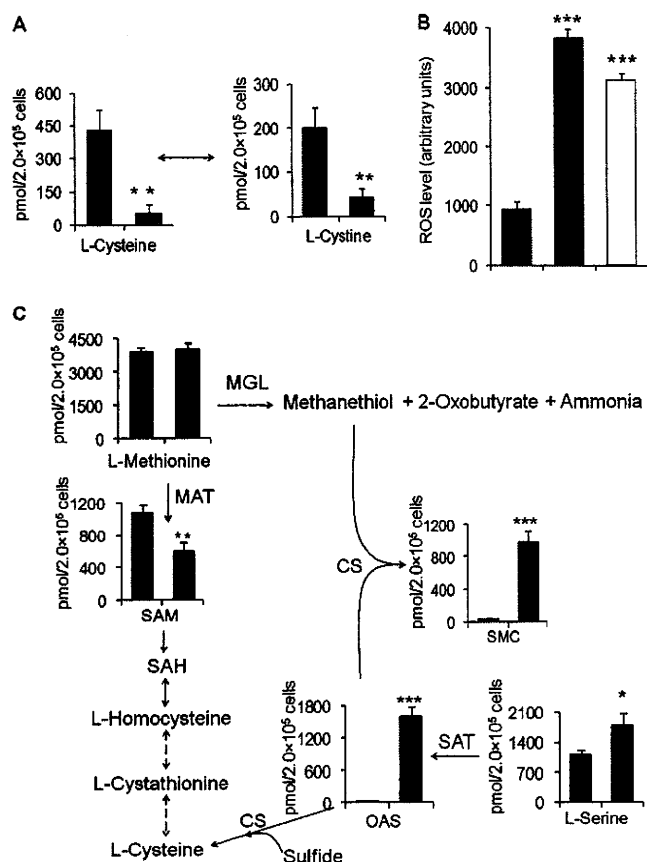
## RESULTS

**L-Cysteine Deprivation Caused Accumulation of O-Acetylserine and S-Methylcysteine**—We first verified that L-cysteine deprivation affected intracellular L-cysteine/L-cystine concentrations in *E. histolytica*. Under normal culture conditions (8 mM L-cysteine), the intracellular concentrations of L-cysteine and L-cystine were  $431 \pm 52$  and  $202 \pm 40$  pmol, respectively, per  $2 \times 10^5$  cells. Approximately two-thirds ( $68 \pm 7\%$ ) of L-cysteine/L-cystine was present in a reduced form, whereas the remaining third was present in an oxidized form. Upon L-cysteine deprivation for 48 h, both L-cysteine and L-cystine decreased to nearly undetectable levels ( $88 \pm 11$  and  $79 \pm 10\%$  decrement, respectively) (Fig. 1A). These results suggest that the intracellular L-cysteine/L-cystine concentrations in *E. histolytica* are greatly affected by the composition of the extracellular milieu.

We also examined whether oxidative stress induced by paraquat affected intracellular L-cysteine/L-cystine concentrations. Treatment of the amoebae with 2 mM paraquat for 10 h led to  $60.6 \pm 8.8$  and  $41.4 \pm 7.3\%$  decreases in the levels of L-cysteine and L-cystine, respectively. Under conditions of L-cysteine limitation, the intracellular levels of reactive oxygen species increased by >4-fold, which was comparable with the 3.3-fold increase observed in paraquat/air-treated cells (Fig. 1B). These results suggest that L-cysteine may be an important scavenger of reactive oxygen species in *E. histolytica*.

Among the ~90 intermediary metabolites that were measured by CE-TOFMS-based metabolomic analysis, which include amino acids, organic acids, and nucleotides (19–21), L-cysteine depletion caused drastic changes in the metabolites of *E. histolytica* involved in sulfur-containing amino acid metabolism (Fig. 1C). L-Cysteine depletion resulted in a sharp increase in O-acetylserine (OAS) (nearly undetectable under normal conditions), an activated form of L-serine that is synthesized from L-serine and acetyl-CoA by SAT. We also ob-

## Response of *E. histolytica* to L-Cysteine Depletion



**FIGURE 1. Effects of L-cysteine depletion on the content of L-cysteine/L-cystine, reactive oxygen species, and metabolites in sulfur-containing amino acid metabolism in *E. histolytica*.** Trophozoites were cultured in normal (black bars) or cysteine-depleted medium (gray bars) for 48 h, or normal medium containing 2 mM paraquat (white bars) for 10 h. Asterisks (\*, \*\*, and \*\*\*) denote statistically significant differences with  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$ , and  $p \leq 0.001$ , respectively, as determined by Student's *t* test, and all of the experiments were performed in triplicate. **A**, effects of L-cysteine depletion on intracellular L-cysteine and L-cystine concentrations. The average content (pmol)  $\pm$  S.D. (error bars) in  $2 \times 10^5$  cells is shown. **B**, effects of L-cysteine depletion (72 h) and oxidative stress on the level of reactive oxygen species. The average level of 2',7'-DCF-DA fluorescence (arbitrary units)  $\pm$  S.D. (error bars) of  $5 \times 10^5$  cells is shown. **C**, effects of L-cysteine depletion on the level of metabolites involved in sulfur-containing amino acid metabolism. The average content (pmol)  $\pm$  S.D. (error bars) in  $2 \times 10^5$  cells, performed in triplicate, is shown. SAH, S-adenosylhomocysteine; MAT, L-methionine adenosyltransferase; MGL, L-methionine  $\gamma$ -lyase.

served a marked increase (nearly undetectable under normal conditions) in S-methylcysteine (SMC), which is suggested to be a storage compound for sulfide and methyl groups in plants (36). L-Cysteine deprivation also caused a  $44 \pm 6\%$  decrement in the level of S-adenosylmethionine (SAM), whereas the level of L-methionine remained unchanged.

SMC can be formed by the methylation of L-cysteine using either SAM or S-methylmethionine as a methyl group donor or by the transfer of the alanyl moiety of OAS to methanethiol ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) by CS (37). To differentiate between these possibilities, we performed metabolic labeling of *E. histolytica* trophozoites with stable isotope  $\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}$ -labeled L-serine and L-methionine in normal and L-cysteine-depleted media for 48 h. Upon the addition of  $[\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ Ser to the L-cysteine-depleted culture medium, comparable levels of  $[\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ SMC and unlabeled SMC, derived from  $[\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ OAS and un-

labeled OAS, respectively, were detected (Fig. 2A). Similarly, when trophozoites were cultured in the presence of  $[\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ Met under the L-cysteine-depleted conditions, we also detected comparable levels of  $[\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ SMC and unlabeled SMC (Fig. 2B). In contrast, under normal conditions, neither SMC nor OAS was detected after  $[\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ Ser or  $[\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ Met labeling (data not shown). Taken together, these data clearly indicate that SMC is not synthesized by SAM- or S-methylmethionine-dependent methylation of L-cysteine; rather, SMC is synthesized in *E. histolytica* from the backbone of Ser and thiomethyl group of methanethiol.

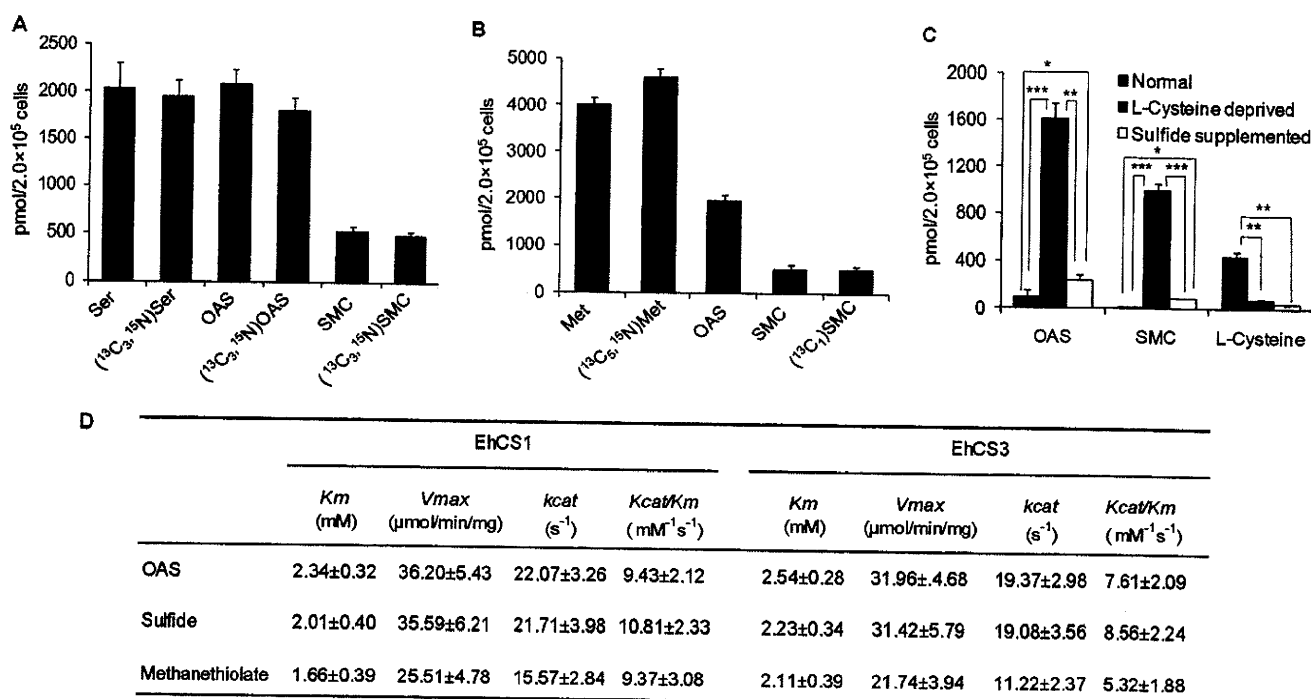
Surprisingly,  $[\text{U-}^{13}\text{C}_3,^{15}\text{N}]$ OAS was not incorporated into either L-cysteine or L-cystine (data not shown), or their levels were too low to be detected by CE-TOFMS. To determine whether the lack of OAS incorporation into L-cysteine was due to the low sulfide concentrations under the *in vitro* axenic growth conditions, we deprived trophozoites of L-cysteine for 45 h and then continued their culture in medium supplemented with 2 mM sulfide for a further 3 h. However, sulfide supplementation did not affect the level of L-cysteine, whereas the levels of SMC and OAS markedly decreased ( $90.6 \pm 3.4$  and  $84.8 \pm 7.7\%$  decrement, respectively) compared with the unsupplemented medium (Fig. 2C). These data suggest that sulfide negatively regulates OAS and SMC synthesis and also imply that the pathway formally called the "L-cysteine biosynthetic pathway" is primarily involved in the synthesis of SMC, but not L-cysteine, at least under *in vitro* culture conditions.

**In Vitro Examination of S-Methylcysteine Synthesis**—To elucidate the enzyme(s) involved in the formation of SMC from OAS and methanethiol, we examined whether different CS isotypes could catalyze the synthesis of SMC. Among the three examined CS isotypes (EhCS1–3), two CS proteins (EhCS1 and EhCS2) are very similar (99% amino acid identity, with two conserved amino acid changes) (5, 6), whereas EhCS3 shares only 83% amino acid identity with the other two isotypes. Both recombinant EhCS1 and EhCS3 efficiently catalyzed the synthesis of SMC using OAS and methanethiol as substrates. As revealed from the kinetic parameters (Fig. 2D), EhCS1 and EhCS3 did not show any preference for either methanethiol or sulfide, because the  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ , and  $k_{cat}/K_m$  values for both of these substrates were comparable.

**L-Cysteine Depletion Repressed Glycolysis and Energy Generation**—Similar to other anaerobic and microaerophilic parasitic protozoa, such as *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*, *E. histolytica* lacks features of aerobic eukaryotic metabolism, including the TCA cycle and oxidative phosphorylation, and primarily generates energy by substrate level phosphorylation (10). The CE-TOFMS-based metabolomic analysis demonstrated that L-cysteine depletion affected the levels of the majority of metabolites involved in glycolysis and its associated pathways (Fig. 3). L-Cysteine-depleted amebae generally contained higher amounts of glycolytic intermediates, with the exception of acetyl CoA and ethanol, than cells cultured under normal conditions. The largest changes caused by L-cysteine depletion were the increment in the levels of glycerol-3-phosphate (2.18  $\pm$  0.25-fold), O-phosphoserine (1.70  $\pm$  0.22-fold), pyruvate (1.66  $\pm$  0.26-fold), 3-phosphoglycerate (1.60  $\pm$  0.17-fold), malate (1.50  $\pm$  0.20-fold),



## Response of *E. histolytica* to L-Cysteine Depletion



**FIGURE 2. Examination of 5-methylcysteine biosynthesis in *E. histolytica*.** A and B, incorporation of labeled L-serine and L-methionine into S-methylcysteine. Trophozoites were cultured in the presence of 6 mM [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>, <sup>15</sup>N]L-serine (A) or 3 mM [<sup>13</sup>C<sub>5</sub>, <sup>15</sup>N]L-methionine (B) in L-cysteine-depleted medium for 48 h. The average contents (pmol) ± S.D. (error bars) of unlabeled and labeled amino acids and their derivatives in 2 × 10<sup>5</sup> trophozoites, performed in triplicate, are shown. C, effects of the supplementation of the medium with sodium sulfide (2 mM) on the levels of OAS, SMC, and L-cysteine, under conditions of L-cysteine deprivation. Asterisks (\*, \*\*, and \*\*\*) denote statistically significant differences with *p* ≤ 0.05, *p* ≤ 0.01, and *p* ≤ 0.001, respectively, as determined by Student's *t* test. D, kinetic parameters of recombinant cysteine synthase 1 (EhCS1) and 3 (EhCS3). All of the reactions were performed in triplicate as described under "Experimental Procedures," and the values are expressed as the means ± S.D.

and fumarate (1.60 ± 0.20-fold). Several other metabolites involved in glycolysis, including glucose 6-phosphate, glucose 1-phosphate, fructose 6-phosphate, and phosphoenolpyruvate also showed slightly elevated levels (1.2–1.5-fold), whereas the levels of fructose 1,6-bisphosphate and dihydroxyacetone-phosphate remained unchanged. In contrast to the significant increases in the glycolytic intermediates upstream of pyruvate in amoebae cultured under L-cysteine-limited conditions, we observed reduced levels of acetyl CoA (29.4 ± 7.1%) and ethanol (40.7 ± 6.7%), suggesting a decrease in glycolytic flux and ATP generation by L-cysteine depletion. A number of other metabolites downstream of acetyl CoA, such as *N*-acetyl-glutamate, *N*-acetyl-β-alanine, *N*-acetyl-leucine, and *N*-acetyl-phenylalanine, were also decreased (supplemental Fig. S1), supporting the premise that the glycolytic flux downstream of pyruvate was repressed.

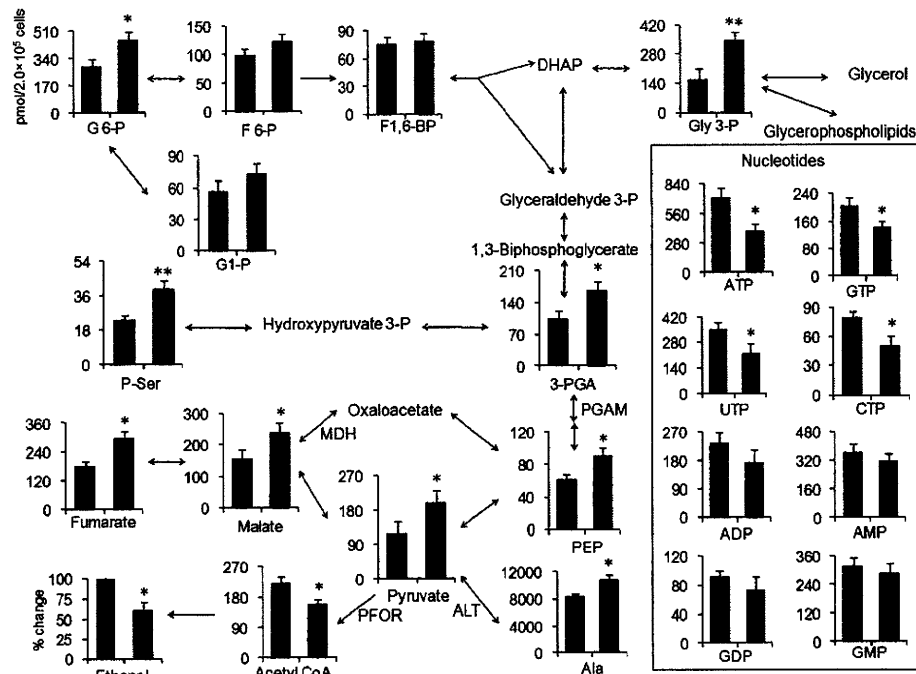
Because glycolysis is the major source of energy generation in *E. histolytica*, a reduced glycolytic flux was thought to result in a decrement in the energy storage molecules of the trophozoites. As expected, the levels of the nucleotide triphosphates ATP, GTP, UTP, and CTP were significantly lower (*p* ≤ 0.05) in the L-cysteine-depleted cells than in the trophozoites maintained under normal conditions (Fig. 3). We also observed slight decreases in the levels of ADP and GDP, whereas the levels of AMP and GMP were unchanged (Fig. 3).

**L-Cysteine Depletion Altered Amino Acid Pools**—Because amino acids are also used for energy production in *E. histolytica* (38), we examined the effects of L-cysteine deprivation

on amino acid levels (supplemental Fig. S1). Next to L-cysteine and L-cystine, L-threonine and L-serine were the most highly modulated by L-cysteine depletion (1.63 ± 0.25- and 2.07 ± 0.29-fold increases, respectively) among the 20 amino acids. In *E. histolytica*, L-threonine and L-serine are catabolized by threonine dehydratase (39) to yield 2-oxobutyrate and pyruvate, respectively, which are in turn used by pyruvate:ferredoxin oxidoreductase for energy generation (40). L-Cysteine depletion also resulted in a slight increase in the intracellular concentration of L-alanine, which is synthesized from pyruvate by L-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase (EHI\_096750 (EAL50292.1) and EHI\_159710 (EAL44861.1)). The levels of the remaining amino acids were not significantly affected by L-cysteine depletion.

**L-Cysteine Depletion Causes Increases in Isopropanolamine, Aminoalcohol Phosphates, and Phosphatidylisopropanolamine**—The metabolomic analysis of *E. histolytica* also revealed that L-cysteine depletion caused marked changes in amino alcohol metabolism (Fig. 4A). L-Cysteine depletion led to a dramatic increase in the levels of isopropanolamine (1-aminopropan-2-ol, Ispn) (5.44 ± 0.76-fold) and isopropanolamine phosphate (Ispn-P, undetected under normal conditions) (Fig. 4A). In addition, trophozoites cultured in L-cysteine-limited conditions showed 7.01 ± 1.38- and 2.8 ± 0.21-fold increases in ethanolamine phosphate (Etn-P) and choline phosphate (Cho-P) levels, respectively, whereas the levels of ethanolamine (Etn) and Cho were unchanged. Both Etn-P and Cho-P are intermediates in the Kennedy pathway,

## Response of *E. histolytica* to L-Cysteine Depletion



**FIGURE 3. Effects of L-cysteine depletion on the level of metabolites involved in central energy metabolism.** Trophozoites were cultured in normal (black bars) or cysteine-depleted medium for 48 h (gray bars), and the average contents (pmol)  $\pm$  S.D. (error bars) of the indicated metabolites in  $2 \times 10^5$  cells are shown (performed in triplicate). Nucleotide metabolites are boxed. Ethanol is shown as a percentage change. Asterisks (\* and \*\*) denote statistically significant differences with  $p \leq 0.05$  and  $p \leq 0.01$ , respectively, as determined by Student's *t* test. *PFOR*, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase; *ALT*, L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase; *PGAM*, phosphoglycerate mutase; *MDH*, malate dehydrogenase; *G 6-P*, glucose 6-phosphate; *G 1-P*, glucose 1-phosphate; *F 6-P*, fructose 6-phosphate; *F1,6-BP*, fructose 1,6-biphosphate; *Gly 3-P*, glycerol 3-phosphate; *3-PGA*, 3-phosphoglycerate; *PEP*, phosphoenolpyruvate; *P-Ser*, O-phosphoserine.

where phospholipids, including phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine, are produced.

Because L-cysteine limitation affected Ispn-P, Etn-P, and Cho-P concentrations, we next investigated whether L-cysteine deprivation influenced phospholipid synthesis by performing lipid profiling of amebic trophozoites cultured under L-cysteine-deprived or normal conditions using two-dimensional TLC (Fig. 4B). We found that in the absence of L-cysteine, *E. histolytica* synthesized an unconventional phospholipid that was verified to be phosphatidylisopropanolamine (PtdIspn) and was undetectable under normal conditions. Quantitation of individual lipids indicated that phosphatidylethanolamine (PtdEtn) decreased by  $39.9 \pm 6.9\%$ , whereas other phospholipids, such as phosphatidylcholine (PtdCho), phosphatidylserine, phosphatidylinositol, and phosphatidic acid, were unchanged (Fig. 4C). These data are consistent with the premise that PtdIspn was formed in a competition for the formation of PtdEtn, the level of which decreased by approximately the identical amount that PtdIspn increased (Fig. 4C). To further demonstrate that PtdIspn was formed from Ispn, *E. histolytica* trophozoites were cultured in normal medium containing 5 mM Ispn for 24 h. Under this condition, trophozoites produced an appreciable amount of PtdIspn (Fig. 4B, panel c).

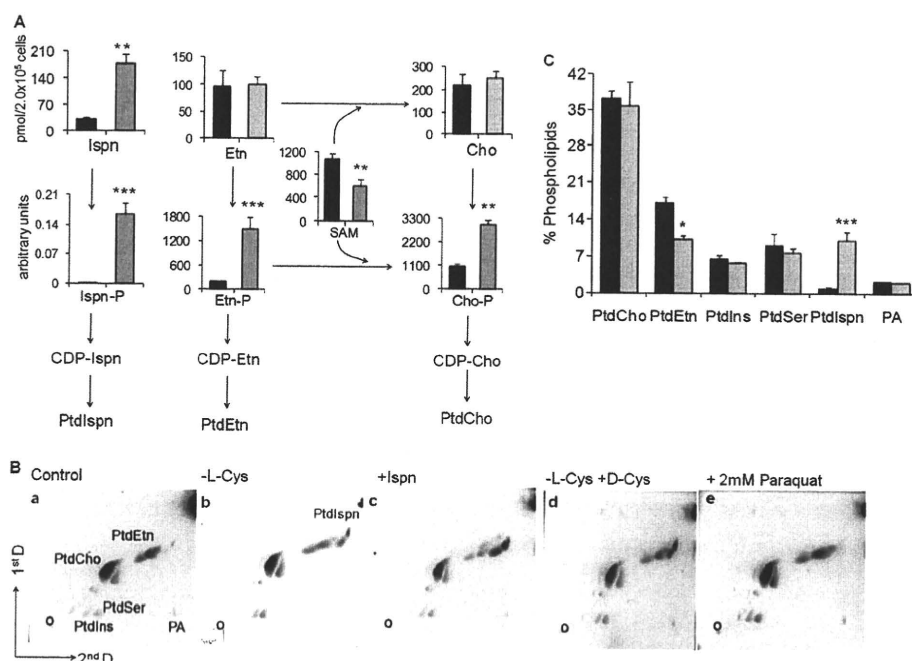
As described above, L-cysteine depletion increased the level of reactive oxygen species. We therefore examined whether oxidative stress caused the observed changes in amino alcohols and phospholipids. It was observed that the lipid profiling of *E. histolytica* trophozoites cultured with 2 mM paraquat

in ambient air for 10 h did not increase PtdIspn (Fig. 4B, panel e). Furthermore, the addition of D-cysteine to the L-cysteine-lacking medium did not reverse the effects of L-cysteine deprivation on the phospholipid profiles (Fig. 4B, panel d). These results confirmed that the generation of PtdIspn caused by L-cysteine depletion was not a result of oxidative stress but represents a specific response to L-cysteine deprivation.

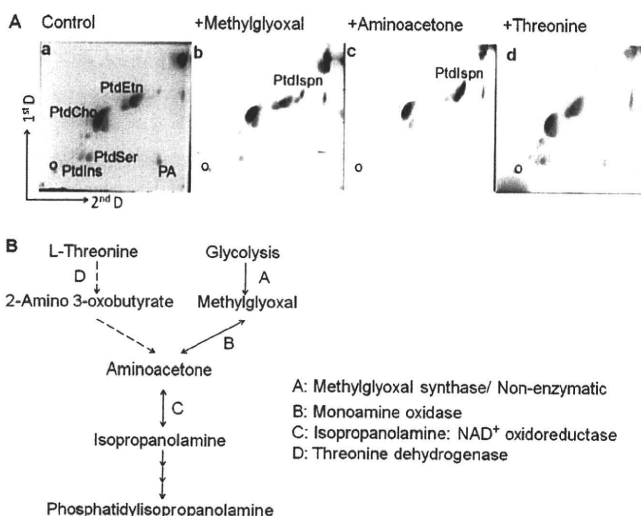
**Examination of Isopropanolamine Biosynthesis in *E. histolytica***—Next, we investigated the synthesis route of Ispn in *E. histolytica*. From studies of *Escherichia coli*, it is known that Ispn is synthesized from 1-aminoacetone by the action of Ispn:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (41). 1-Aminoacetone is formed by the breakdown of L-threonine by L-threonine dehydrogenase (42) or is alternatively synthesized from methylglyoxal by monoamine oxidase, which catalyzes the interconversion of methylglyoxal and aminoacetone (43). Methylglyoxal is a by-product of several metabolic pathways, with glycolysis being the most important source (44). Methylglyoxal is synthesized either enzymatically or nonenzymatically from dihydroxyacetone phosphate or glyceraldehyde 3-phosphate (44).

To examine the Ispn synthesis pathway in *E. histolytica*, we cultured amebae in medium supplemented with either methylglyoxal, aminoacetone, or L-threonine and examined the resulting lipid profiles. We found that supplementation with 2 mM methylglyoxal or 4 mM aminoacetone, but not 50 mM L-threonine, led to the synthesis of PtdIspn (Fig. 5A). These results are consistent with the premise that *E. histolytica* is capable of Ispn synthesis from methylglyoxal and possesses the

## Response of *E. histolytica* to L-Cysteine Depletion



**FIGURE 4. L-Cysteine depletion affected phospholipid metabolism.** *A*, effects of L-cysteine depletion on the levels of metabolites involved in the Kennedy pathway of phospholipid metabolism. Trophozoites were cultured in normal (black bars) or cysteine-depleted medium for 48 h (gray bars). The average contents (pmol)  $\pm$  S.D. (error bars) in  $2 \times 10^5$  cells in triplicate are shown. Asterisks (\*, \*\*, and \*\*\*) denote statistically significant differences with  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$ , and  $p \leq 0.001$ , respectively, as determined by Student's *t* test. *B*, profiles of phospholipids derived from trophozoites cultured under various conditions (panels *a–e*), analyzed by two-dimensional TLC. Trophozoites were cultured in normal culture medium (panels *a*, *c*, and *e*) or L-cysteine-depleted medium supplemented (panels *b* and *d*), without (panels *a* and *b*) or with 5 mM Ispn (panels *c*), or 8 mM D-cysteine (panels *d*) for 48 h or 2 mM paraquat for 10 h (panels *e*). Circles in the bottom left corners indicate the spots where the samples were applied. *C*, quantitation of the phospholipid species (percentage) derived from trophozoites cultured using normal (black bars) or L-cysteine-depleted (gray bars) medium. Asterisks (\* and \*\*\*) denote statistically significant differences with  $p \leq 0.05$  and  $p \leq 0.001$ , respectively, as determined by Student's *t* test. PtdSer, phosphatidylserine; PtdIns, phosphatidylinositol; PA, phosphatidic acid.



**FIGURE 5. Examination of isopropanolamine biosynthesis in *E. histolytica*.** *A*, effects of the supplementation of potential precursors to the culture medium on the synthesis of phosphatidylisopropanolamine. Trophozoites were cultured in normal culture medium supplemented without (panel *a*) or with 2 mM methylglyoxal (panel *b*), 5 mM aminoacetone (panel *c*), or 50 mM L-threonine for 24 h (panel *d*), and the lipids were then analyzed by two-dimensional TLC. Circles in the bottom left corners indicate the spots where the samples were applied. *B*, possible pathways of isopropanolamine biosynthesis. The reactions depicted by solid arrows were demonstrated in this study, whereas those indicated by broken arrows are considered to be absent in *E. histolytica*. PtdSer, phosphatidylserine; PtdIns, phosphatidylinositol; PA, phosphatidic acid.

enzymatic activities of monoamine oxidase and Ispn:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (Fig. 5B).

## DISCUSSION

**Identification of SMC and OAS as the Major Metabolites Increased upon L-Cysteine Deprivation**—In the present study, using a CE-TOFMS-based approach (19–21), we identified novel metabolic changes caused by L-cysteine deprivation in the anaerobic/microaerophilic protozoan parasite *E. histolytica*. The major advantages of CE-MS analysis include its extremely high resolution and ability to simultaneously quantify charged low molecular weight compounds (19–21). We demonstrated that L-cysteine deprivation causes a dramatic accumulation of SMC and OAS (Fig. 1C). SMC is a sulfur-containing amino acid that has never been detected in protozoa but is widely present in relatively large amounts in several legumes, where it is considered to serve as a sulfur storage compound (36, 37). Using stable isotope-labeled L-serine and L-methionine, we showed that SMC is synthesized from these amino acids in *E. histolytica* via OAS and methanethiol, respectively, which is similar to the pathway reported in *A. thaliana* (36). Interestingly, the increase in both SMC and OAS was mitigated by supplementation of the culture medium with 2 mM sulfide. These results have solved one enigma concerning the biological roles of the sulfur assimilatory *de novo* L-cysteine biosynthetic pathway in *E. histolytica*.

**Role of L-Cysteine Biosynthetic Pathway**—Although *E. histolytica* is a unique organism that constitutively expresses high

levels of multiple cytosolic isotypes of CS and SAT, the physiological significance of the L-cysteine pathway and its redundancy are not well understood (8, 9, 18). *In vitro* cultivation of amebic trophozoites requires high concentrations of L-cysteine, which cannot be replaced by other thiols (16), indicating that the synthesis pathway may not be sufficient for the production of L-cysteine and might play an unknown role. Our metabolomic study using labeled L-serine did not support the hypothesis that L-cysteine is formed from L-serine and sulfide via OAS by the sequential action of SAT and CS, because labeled L-serine was not incorporated into L-cysteine (data not shown). We also demonstrated that amebic CS isotypes can catalyze the formation of SMC from OAS and methanethiol, unlike the CS from *T. vaginalis* (45), and also possess robust L-cysteine forming activity (Fig. 2D).

We also revealed that OAS is exclusively directed for the synthesis of SMC, but not L-cysteine, even in the presence of high concentrations of substrates. The apparent inability of *E. histolytica* to incorporate OAS into L-cysteine under L-cysteine-depleted conditions cannot be explained by the limiting concentration of sulfide under axenic culture conditions because the addition of sulfide did not increase L-cysteine levels, whereas the accumulation of OAS and SMC was immediately ceased by sulfide supplementation (Fig. 2C). In fact, the amebic trophozoites cultured under normal conditions contained appreciable concentrations of sulfide (134  $\mu\text{M}$ ) (46). The lack of OAS incorporation into L-cysteine is also not attributable to the low substrate specificity of CS toward sulfide, because the  $K_m$  values of CS isotypes for sulfide were comparable with those for methanethiolate (Fig. 2D). Thus, the preferred utilization of OAS by *E. histolytica* for SMC synthesis, but not for L-cysteine production, suggests that the L-cysteine biosynthetic pathway plays a major role in SMC production, whereas the apparent defect of L-cysteine production by this pathway *in vivo* remains puzzling.

**Regulation of OAS Synthesis**—The marked increase in OAS observed under L-cysteine deprivation is also worthy of attention. Similar to SMC, the level of OAS under normal culture conditions was nearly undetectable. Unlike other organisms, *E. histolytica* possesses three apparently functionally redundant, cytosolic SAT isozymes (SAT1–3) (9). Because these SAT isozymes have low to high sensitivity to feedback inhibition by L-cysteine, OAS and SMC were presumed to be formed even in the presence of high concentrations of L-cysteine, mainly by L-cysteine-insensitive SAT3. Thus, the fact that OAS and SMC were undetectable in the amebae cultured under normal conditions indicates that the activity of SAT, particularly SAT3, is repressed by unknown mechanisms. The fact that CS activity is a few orders of magnitude higher than SAT activity in the amebae may explain why OAS was not detected under the normal conditions, but it does not explain why SMC is not synthesized. The observed increase in OAS under L-cysteine depletion also indicates that L-cysteine-sensitive SAT1 and SAT2 are derepressed (*i.e.* L-cysteine-mediated feedback inhibition of SAT1/2 was reversed) under L-cysteine depletion.

In addition to the feedback inhibition, the cysteine biosynthetic pathway is also regulated by the bi-enzyme complex of

SAT and CS (47). This complex is not involved in the metabolic channeling of OAS from SAT to CS, because OAS freely diffuses out of the complex. The formation of the SAT-CS complex (cysteine synthase complex) was shown to modulate the kinetic parameters of both enzymes. It was shown that the complex was dissociated by the elevated OAS levels (47). It is possible that OAS affects the formation and dissociation of the cysteine synthase complex in *E. histolytica* and the SMC but not L-cysteine forming activity of the complex. Although OAS also acts as an inducer of the L-cysteine regulon in bacteria (48), the gene expression of SAT and CS isotypes was not affected upon L-cysteine depletion in *E. histolytica* (data not shown).

**Role and Fate of SMC**—Because genes encoding other enzymes that utilize methanethiol as a substrate, such as O-acetylhomoserine sulfhydrylase (EC 2.5.1.49) and methanethiol oxidase (EC 1.8.3.4), are absent in the *E. histolytica* genome (10), SMC synthesis is likely the major salvaging pathway of methanethiol. SMC is present in relatively large amounts in several legumes, and there are a few lines of evidence demonstrating that the methyl moiety of SMC is incorporated into various metabolites (methionine, choline, and creatine) and proteins (pectin) (37, 49–51). In plants (*e.g.* *Brassica pekinensis*), SMC can also be demethylated to generate L-cysteine (52). Metabolic labeling with SMC revealed that L-methionine and L-cysteine are formed from SMC in *Neurospora crassa* grown in low sulfur medium (53). In addition, methionine and cystathionine-auxotrophic mutants of *N. crassa* were able to grow when supplemented with SMC (53). Despite evidence from the studies, the fate of SMC in *E. histolytica* remains to be established because neither labeled L-cysteine nor L-methionine was detected using isotope-labeled serine in our metabolomic analysis. The role of methionine  $\gamma$ -lyase in *E. histolytica* could be to generate methanethiol for the synthesis of SMC. It has been shown in other organisms that the methyl and thiomethyl moieties of SMC are transferred to unidentified metabolites or proteins (49–53).

**L-Cysteine Deprivation Affected SAM and Amino Acid Concentrations, Glycolysis, and Energy Generation**—L-Cysteine depletion results in reduced levels of SAM, a precursor for polyamine biosynthesis and the essential methyl donor for numerous transmethylation reactions, including DNA methylation. This decrement in the SAM level is likely caused by either the reduction of SAM production by methionine adenosyltransferase or increased utilization of SAM. Because the amount of polyamines, such as putrescine, spermidine (supplemental Fig. S1), and N-acetylputrescine (data not shown), remained unchanged, SAM-dependent methylation may have increased upon L-cysteine deprivation. Because the methionine adenosyltransferase activity from various organisms is inhibited by nitric oxide-mediated nitrosylation of the cysteine residues in its active site (54), it is conceivable that methionine adenosyltransferase activity is inhibited by L-cysteine deprivation. The observed increase in L-threonine and L-serine can be attributed to their increased uptake, which is supported by the fact that L-cysteine is a strong inhibitor of L-threonine and L-serine uptake in the BSC-1 epithelial cell line (55).