

Title	Identification and Characterization of Two Isoenzymes of Methionine γ -Lyase from <i>Entamoeba histolytica</i> A KEY ENZYME OF SULFUR-AMINO ACID DEGRADATION IN AN ANAEROBIC PARASITIC PROTIST THAT LACKS FORWARD AND REVERSE TRANS-SULFURATION PATHWAYS
Sub Title	病原性赤痢アメーバのメチオニンガンマリアーゼアイソザイムの同定と解析: 硫黄転移経路を持たない嫌気性寄生原虫における含硫アミノ酸分解酵素の重要性
Author	所, 正治
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.1 (2004. 3) ,p.9-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040302-0009

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Identification and Characterization of Two Isoenzymes of Methionine γ -Lyase from *Entamoeba histolytica* A KEY ENZYME OF SULFUR-AMINO ACID DEGRADATION IN AN ANAEROBIC PARASITIC PROTIST THAT LACKS FORWARD AND REVERSE TRANS-SULFURATION PATHWAYS

(病原性赤痢アメーバのメチオニンガンマリアーゼアイソザイムの同定と解析：
硫黄転移経路を持たない嫌気性寄生原虫における含硫アミノ酸分解酵素の重要性)

所 正 治

内容の要旨

(目的) 病原性腸管内寄生原虫である赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* においては、グルタチオン代謝経路が存在しないことから、システイン、メチオニンなどの含硫アミノ酸とその代謝経路が細胞内チオール濃度の調整により抗酸化機能を補完していると考えられてきた。そこで、本研究では、含硫アミノ酸代謝において中心的な役割を果たしているピリドキサルリン酸依存酵素の同定と解析により、これまで未解明であった赤痢アメーバの特異な含硫アミノ酸代謝経路の解明と、この経路をターゲットとした薬剤開発の可能性を評価することを旨とした。

(方法) 赤痢アメーバのゲノムデータベース検索により決定されたピリドキサルリン酸依存酵素の遺伝子配列を用い、PCRによりcDNA libraryからクローニング、組換えタンパク質を作成し酵素学的解析を行った。また、培養赤痢アメーバを材料とした本酵素の粗製性を行い、その詳細な解析を行うとともに、本酵素を標的とした阻害剤およびプロドラッグの赤痢アメーバ培養系への影響を評価した。

(結果と考察) 赤痢アメーバでは、2つのピリドキサルリン酸依存酵素遺伝子が得られたが、組換えタンパク質の酵素学的解析より、これらの遺伝子はメチオニンガンマリアーゼの2つのアイソタイプと考えられた。したがって、赤痢アメーバは、他種の生物とは異なり、メチオニンとシステインを転換する硫黄転移経路を欠損すると同時に、広範な含硫アミノ酸を分解するメチオニンガンマリアーゼによる細胞内チオール濃度の調整系を持つものと考えられた。また、ピリドキサルリン酸依存酵素阻害剤であるプロバジルグリシンの培地への添加により、赤痢アメーバの粗抽出液中におけるメチオニンガンマリアーゼ活性は完全に阻害されるにもかかわらず、栄養体の増殖抑制は軽度であり、培養条件下では本酵素はその生存に必須ではないものと考えられた。しかしながら、メチオニンアナログであるトリフルオロメチオニンをを用いた場合の殺原虫作用は、メトロニダゾールの約2倍のIC₅₀を示し、また、この効果は、プロバジルグリシンの存在下では抑制され、本酵素を必須とするプロドラッグであることが示唆された。

論文審査の要旨

含硫アミノ酸代謝は微生物でも種によって多様性に富んでいる。ヒトとは異なるユニークな進化を遂げている原虫である赤痢アメーバにおいても、薬剤の新しい標的としての特異な代謝経路が見出されることが予想される。本研究は、生理的に重要な含硫アミノ酸であるメチオニンとシステインの相互変換経路のkeyとなる酵素であるピリドキサルリン酸依存酵素の解析を試み、赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸代謝経路の全体像を示すと同時に、ほ乳類には認められない特異な含硫アミノ酸分解酵素(メチオニンガンマリアーゼ)を見出し、その同定と解析、更に本酵素を標的とした薬剤開発の可能性の評価を行い、メチオニンアナログの殺アメーバ効果を明らかにしたものである。審査では、メチオニンガンマリアーゼの組換えタンパク質を用いたプロバジルグリシンによる阻害反応における阻害剤のslow bindingについて、解析方法の詳細が問われ、本酵素におけるslow bindingの解析は、プロバジルグリシンの酵素蛋白へのbindingを直接測定したのではなく、一定時間阻害剤とのインキュベーション後の見かけ上の阻害反応解析を酵素活性測定によりおこなった旨が回答された。また、赤痢アメーバにおけるメチオニンガンマリアーゼの高次構造がホモテトラマーであることについて、近縁の原虫であるトリコモナスとの比較の上での特徴について問われ、トリコモナスにおいてはヘテロテトラマーの構造を取る1種類のメチオニンガンマリアーゼが発現しているものと考えられているのに対して、赤痢アメーバにおいては、それぞれがホモテトラマーの構造を取る2種類のアイソザイムがともに細胞質中に発現しているものと回答された。また、メチオニンガンマリアーゼ遺伝子による系統樹解析において、近縁の原虫とは異なり、むしろ古細菌と同じクラスターに赤痢アメーバの遺伝子が含まれると云う解析結果について、このような遺伝子のホリゾンタルトランスファーを示唆する所見の赤痢アメーバにおける意義が問われ、赤痢アメーバにおいては多くの代謝経路でモザイク状と形容される他種由来もしくは他種との共通祖先を示唆する遺伝子群が存在すると云う系統樹解析の結果が示されており、本研究のデータはこれらに矛盾するものではないとの回答がなされた。また、メチオニンガンマリアーゼによって含硫アミノ酸から産生される分解産物の生理的機能に関連し、DNAのメチル化の制御、レドックス制御等においていかなる機能を担っているのかは興味深い課題であり、今後検討すべきであるとの指摘がなされた。以上、本研究は、今後更に検討を継続する余地を残しているものの、赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸代謝経路における分解系の重要な酵素の解析を行い、かつこれを標的とした抗原虫薬開発の可能性を示したものであり、有意義な貢献であると評価された。

論文審査担当者 主査 熱帯医学・寄生虫学 竹内 勲

微生物学 小安 重夫 医化学 末松 誠

微生物学 石川 博通

学術確認担当者:

査査委員長: 小安 重夫

試問日: 平成16年1月7日