

## 6. ニューモシスチス・カリニの分子生物学とその臨床応用

中村義一 北田一博

(掲載決定:平成3年8月7日)

### 1. はじめに

カリニ肺炎は、日和見感染症の一つで、*Pneumocystis carinii* (以下 *P. carinii* と略記) の感染・増殖によって起こる。カリニ肺炎は、免疫不全患者に発症しやすく、重篤化するケースが多い。特に、AIDS (acquired immune deficiency syndrome: 後天性免疫不全症候群) 患者の3分の2の症例に本疾患が合併しており、死因の第1位を占めている (Selik, 1987)。米国では、既に1981-1988年の間に、52,000人のAIDS患者がカリニ肺炎を併発し、今後3年間でさらに、15万人の発症が予想されている (Telzak, 1990)。カリニ肺炎はまた、臓器移植患者が免疫抑制処置をうけたときにも発症しやすことが知られている。

*P. carinii* は、大きさが約数  $\mu\text{m}$  と赤血球より少し小さい、真核系の微生物である。分類学的には、原生動物 (Protozoa) とする説と、菌類 (Fungi) とする説とが提出されてきた。これは、薬剤耐性特性と形態学的な観察に基づく結果で、*P. carinii* が、増殖状態の単細胞から成るトロホゾイト (栄養体) と、休止状態の8個のスポロゾイト (小芽体) から成るシストの間を変化する生活環を持つために (Yoshida, 1989)、この形態が原生動物と菌類とに共通する性質と考えられた。

*P. carinii* は1909年に発見され (Chagas, 1909)、1914年に命名された。その後、長らく *P. carinii* に関する研究は放置された状態が続いたが、第2次世界大戦後、ヨーロッパで肺炎が多発した際に行われた研究により、1960年代になって *P. carinii* が肺炎の起炎菌のひとつであると認められるようになり、研究が復活した。その後1980年代に至る間に、免疫抑制剤投与によるラットでのカリニ肺炎発症のモデル動物実験系の開発 (Frenkel, 1966)、抗 *P. carinii* 薬であるペンタミジンの発見 (Ivady *et al.*, 1967)、一過的な *in vitro* 培養の報告 (Pifer *et al.*, 1977) などが行われた。しかし、カリニ肺炎自体の症例数が少ないことから、これが重大な疾患であると認識されるには至らず、研究が大きく進展するには至らなかった。しかし、1980年代になって事態が一変した。AIDSの流行に伴なって、カリニ肺炎の発症が急増するようになり、その診断・治療・予防法の

確立が緊急の問題となった。しかし、基礎的な研究の欠落のために、これに即応できる態勢にはなかった。

### 2. *P. carinii* の分子系統学的研究

従来は、古典的な立場から系統・分類が行われていたが、近年は、共通に保存されている遺伝子の塩基配列がどの程度に変化しているかに基づいて系統樹を作成する、分子進化論的な研究が活発に行われている。最も詳細な分子系統樹が作成されている例としては、リボゾーム RNA の一つである 5S rRNA の塩基配列が、既に700近い生物種で決定され、広範な分子系統樹として確立している (Specht *et al.*, 1990)。我々も、*P. carinii* から 5S rRNA を分離し、その RNA 塩基配列を分析することによって、分子系統樹上での位置づけを行なった (Watanabe *et al.*, 1989)。決定した 5S rRNA の 2次構造は真核生物に共通した構造をとり、コンピューターによる類似性マトリックス解析の結果、*P. carinii* は Protista Fungi に属し、アメーバや変形菌類 (Myxomycota)、接合菌類 (Zygomycota) に近い仲間であることが示された。つまり、*P. carinii* は、マラリアやトリパノゾーマのような典型的な原生動物 (Protozoa) と菌類 (Fungi) の中間に位置する生物種であることが明かになった。

この結論は、米国のグループが独立に行なった 18S rRNA サブユニットの分析からも支持されている (Edman *et al.*, 1988)。ちなみに、*P. carinii* から rRNA を分離し、電気泳動分析すると、その大きいほうのサブユニットは、ラットで代表される典型的真核生物の 28S サイズではなくて、酵母と同じ 26S のサイズである (図1)。

### 3. *P. carinii* 表面抗原の構造

*P. carinii* の病原性を明かにするためには、その細胞表面構造の生化学的な研究が不可欠である。*P. carinii* のように、培養が難しい材料の場合には、単クローン抗体を用いた研究が効果的である。我々も、これまで、*P. carinii* 表面抗原に対する単クローン抗体 (5G10抗体) を利用して、表面抗原の生化学的な解析を行なった (Tanabe *et al.*, 1989)。

5G10単クローン抗体で、ラットの肺切片を蛍光染色すると、*P. carinii* 感染肺だけが特異的に反応し、非

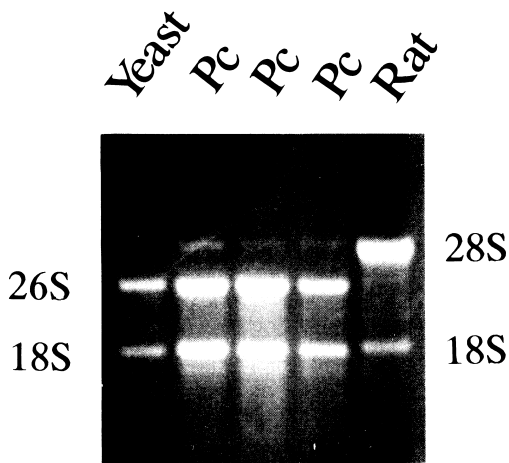


図1 リボソーム RNA の電気泳動。独立に *P. carinii* から分離した 3 種類の標品 (Pc と表示) を、ラットと酵母由来の rRNA と比較分析した。

感染肺は反応しない。さらに、電子顕微鏡で単クローン抗体の結合部位を、フェリチン標識法で観察すると、*P. carinii* のシスト表面にグレーンが局在する。これらの形態学的な解析から、5 G10抗体は表面抗原と特異的に反応することが最初に明かになった。

図2の(a)には、*P. carinii* の全タンパク質の SDS ゲル電気泳動の染色パターンを示してあるが、約115,000の分子量の位置に主要タンパク質の濃いバンドが観察される。驚くべきことに、総タンパク質の約7割に相当する量である。我々は、この分子種を p115 と命名した。単クローン抗体 5 G10は、免疫ブロッティング法で、この P115分子と反応する (図2 b)。このことから、P115が *P. carinii* の主要表面抗原となっていることがわかる。P115分子は単一種ではなく、2次元電気泳動分析すると、約6種類のわずかに等電点の異なるタンパク質群に分離する。これらの isoelectric variants は等しく単クローン抗体 5 G10と反応する。そしてこれら6種類の variants のスポットを独立に分離して、ペプチド・マッピングを行なったところ、一致したパターンが得られるため、タンパク質部分の構造は共通であると考えら

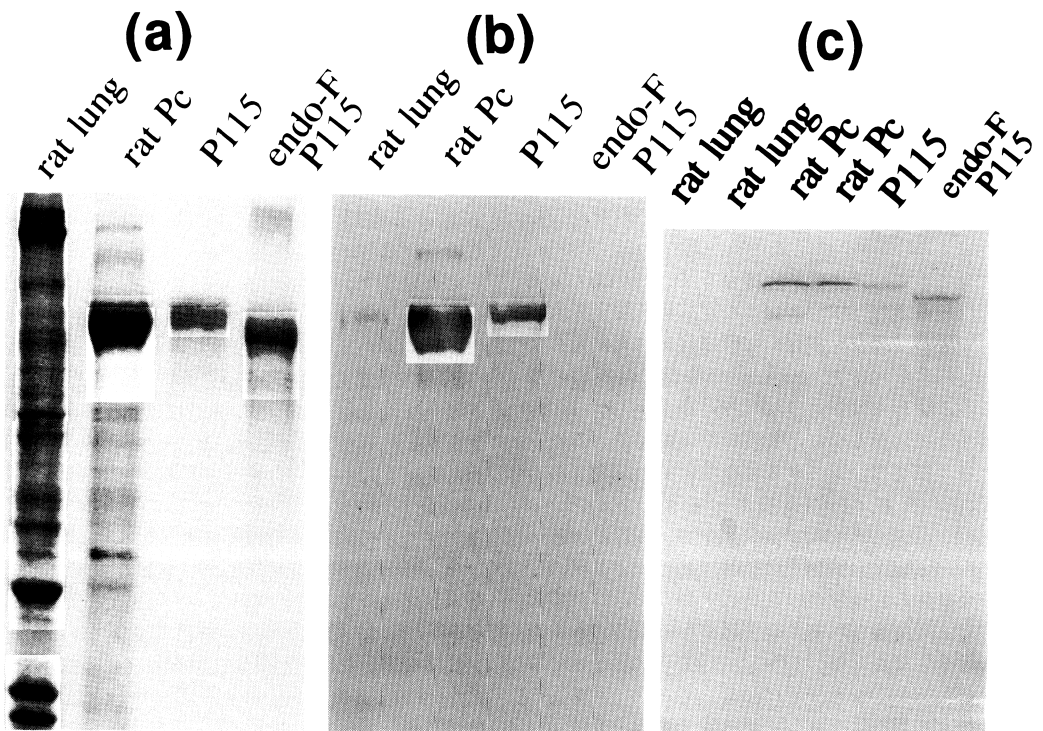


図2 抗 P115単クローン抗体のエピトープ分析。ラット肺タンパク質 (rat lung), *P. carinii* タンパク質 (rat Pc), 精製 P115分子 (P115), endo-F 処理した P115分子 (endo-F P115) を各々電気泳動し、コマジー染色(a), 5 G10抗体染色(b), 抗 PC 3抗体染色(c)した結果を示す。

れる。

興味深いことに、マンノシダーゼや endo-F 酵素によって P115 分子を処理すると、分子量がわずかに小さくなる。さらに、2 次元電気泳動上でも、単一のスポットに収斂する。このことから、P115 分子種の等電点の違いは、糖鎖の構造の違いに基づくものであることが示唆された。さらに、P115 分子種を構成する糖鎖成分を微量分析した結果、マンノースが主要な構成成分であることがこれまでにわかっている。

P115 糖タンパク質が *P. carinii* に極めて多量に含まれ、主要表面成分となっているという事実は、その糖タンパク質が *P. carinii* の感染・増殖等の病原性に重要な役割を占めている可能性を強く示唆する。

#### 4. *P. carinii* 表面抗原遺伝子のクローニング

*P. carinii* のゲノム DNA ライブラリーは 1988 年に我々の研究室から報告されたものが最初で (Tanabe *et al.*, 1988), その後、欧米の数研究室から報告が続いた。DNA ライブラリーの作製は、同時に、*P. carinii* から生体高分子を分離した初めの実験でもあった。我々は、P115 遺伝子のクローニングを目的として、ゲノム・ライブラリーのほかに、cDNA ライブラリーの作製を行なった。*P. carinii* から分離したポリ(A)-RNA から cDNA を合成し、 $\lambda$ gt11 ファージに挿入した。 $\lambda$ gt11 ファージは発現ベクターとして多用されており、目的とする遺伝子産物を  $\beta$  ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として検出できるシステムである。当初、前述した 5 G10 抗体を始めとする各種の単クローン抗体を用いて、cDNA ライブラリーをスクリーニングしたが、不成功に終わった。その原因は、用いた単クローン抗体が、ことごとく糖鎖をエピトープとする抗体であったためである。

図 2 (b) に示すように、P115 分子から、endo-F 処理で、アスパラギンに結合している糖鎖を外すと、5 G10 抗体は反応しなくなる。これまでに、*P. carinii* を抗原として作製した単クローン抗体が全て、糖鎖認識抗体であった事実は、*P. carinii* 細胞表面が抗原性の強い高マンノース型のグルカンで覆われていることを示唆する。

ペプチド抗体は、V8 プロテアーゼによる P115 限定分解断片をアミノ酸配列分析し、11 鎖長 (PC2)、および 18 鎖長 (PC3) の独立した領域のペプチドを人工合成して、これらに対する単クローン抗体として作製した。図 2 (b) に示すように、endo-F 処理した P115 分子は、抗 PC3 抗体に対する反応性を保持している。これらの抗ペプチド性単クローン抗体を用いて、cDNA ライブラリーから P115 遺伝子のスクリーニングを行なった。現在、これら陽性クローンの塩基配列分析を行っており、P115 遺伝子の全構造の解明が待たれる。

#### 5. 臨床診断への応用

カリニ肺炎が決して稀な疾患でなくなった現在、高感度で容易な診断法の開発が望まれる。Kovacs らはモノクローナル抗体による検査法を開発し、誘起喀痰であれば 100% 近い感度で *P. carinii* を検出できるとしている (Kovacs *et al.*, 1988)。これに対して、我々は、5 S rRNA の分子系統学的研究に基づいて、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いた DNA 診断法を開発した (Kitada *et al.*, 1991)。PCR は、向き合った 1 対のプライマーに挟まれる塩基配列部分を、耐熱性の DNA ポリメラーゼで繰り返し合成させることによって、特定の DNA 部分を高度に増幅する方法として開発され (Saiki *et al.*, 1985)、既に、高感度 DNA 診

	'5S sense' primer (20 mer)	'5S antisense' primer (20 mer)
<i>P. carinii</i>	5' A-G-UUACGGCCAUACCUCAGA	AAUACGACGUGCUGCAGCUUU- 3'
(A) <i>A. castellanii</i>	G...A.....UG·GC	...C·AC.....C·U·U--C·
<i>P. polycephalum</i>	G...A·G.....UAAG·	...C·C.....UU-C·U
<i>D. acuminosporus</i>	.....A.....U·AACUU	.....A.....C·U.....
<i>P. inunctatus</i>	·U·C·G.....CAU	...C·GGU.....AG-...
<i>S. pombe</i>	G·U·C.....AG·C	...C·GG.....U·G-C·
<i>S. cerevisiae</i>	G.....G.....U·ACC·	..ACUC·G.....AU-C·
(B) <i>C. albicans</i>	G.....G.....U·AGC·	..ACUAAU.....AU-C·
<i>A. nidulans</i>	·C·A.....A.....GGGUGUG	...C·CUAC·U·U·UG----
<i>C. albidus</i>	·U·CC.....GGA·UCU	...C·U·G.....UG·U----
(C) <i>S. aureus</i>	-UC·GGU·A·U·G·AAG·	·GAGUAGAAC·U·CAGGC·-
<i>H. aegyptius</i>	-UC·GG.....G·GUG·G·U	·GAGUAGG·CA·C·CAGG--U
<i>M. lysodeikticus</i>	GUC·GG.....G·GUG·G	·GAGUAGGUC·C·C·GACA·

図 3 PCR 増幅用プライマーの検討。プライマーに用いる *P. carinii* の 5 S rRNA 塩基配列を、他の関連ある生物種と比較し、異なる部分を示した。(A) 分子系統学的近縁種、(B) 病原性真菌・呼吸器疾患関連真菌、(C) 上気道常在性細菌。

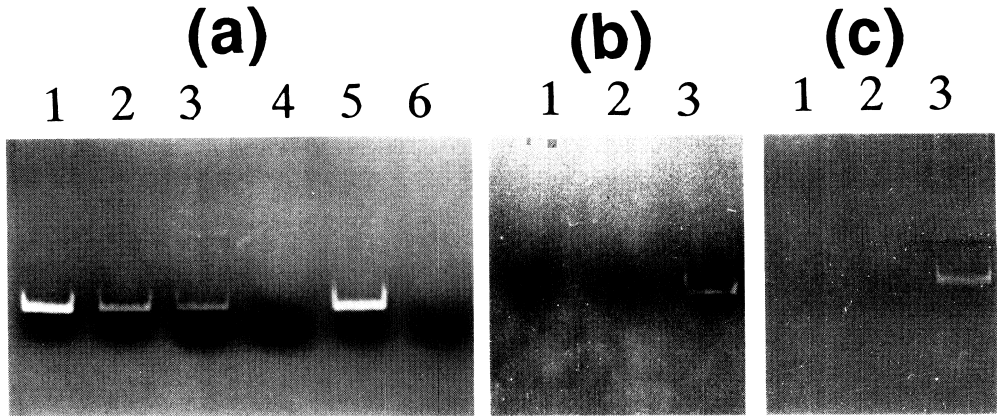


図4 5S rRNA 遺伝子を利用した *P. carinii* 感染の PCR 診断。増幅した DNA の有無をアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。(a)実験動物の肺標品診断。レーン1, 感染マウス肺; レーン2, 感染マウス肺のパラフィン切片; レーン3, 潜在感染マウス肺; レーン4, 非感染マウス肺; レーン5, 感染ラット肺; レーン6, 非感染ラット肺。(b)針穿刺法による AIDS 患者の肺生検診断。3人のなかで、レーン3の患者が陽性と判断された。(c)血液を使った診断。3人の AIDS 患者の血液のうちで、レーン3の患者が陽性と判断された。

断法として、臨床応用されている。図3は、データベースに基づいて、プライマー部分の塩基配列を、*P. carinii* の近縁種、病原性真菌、および上気道常在性細菌と比較検討したもので、理論的にこれらとは交差反応を起こさない。実験的にも、非特異的な増幅はこれまで見られていない。

PCR 診断の有効性は、まずモデル動物実験で確かめられ (図4(a)), その後、経皮的肺吸引や血液等の検体に対する臨床試験で確認された (図4(b)(c))。検出感度は、single-cell-sensitivity のレベルである。増幅した DNA の塩基配列には、ヒト、ラット、マウス等の宿主間相違は見られていない。

現在、医科学研究所においては、通常の *P. carinii* の検査法として、喀痰に対する PCR 診断が行なわれており、診断の信頼性が実証されるとともに、バイオプシーを回避することによって、患者のみならず医師・ナース側のリスクを軽減することに大へん役だっている。ペントタミジン、ST 合剤等の、毒性が強い薬剤を用いた際の、効果的な投薬計画を決める上で、経時的に採取した喀痰に対する PCR 診断が、治療効果の直接的マーカーとして有効である。

#### 6. おわりに

*P. carinii* に関する基礎研究が大きく遅れた理由として、AIDS の流行まで、疾患として重大視されていなかったことや、培養が困難であるという事情が指摘でき

るが、いまひとつには、生化学や分子生物学を背景にした研究者の参加がなかったためでもある。我々のグループは、これまでバクテリアを材料とする遺伝子発現調節機構の分子遺伝学的研究を行ってきたが、1987年から *P. carinii* の分子生物学の構築とその臨床応用を目的として、本研究を開始した。

*P. carinii* の感染・増殖・病原性・宿主免疫防御反応、さらには生活環における分化といった問題までを含めて考えてみても、主要表面抗原 P115糖タンパク質の構造・機能・可変性 (antigenic variation)・分化特異性 (stage specificity) 及びその発現・生合成という問題の理解が重要であろうと考えている。そのためには、表面抗原遺伝子の分子遺伝学的解析と糖鎖構造の生化学的解析が不可欠である。これらの基礎的な研究は、DNA 診断、特異抗体による受動免疫療法、ワクチン予防などの臨床応用を展開する基礎となるものである。

近年、欧米での寄生虫学では、トリパノゾーマやマラリアを中心にして、エポック・メーカーな新発見が相次いでいる。RNA エディティング、トランス・スプライシング、表面抗原スイッチングなどである。これらの制御様式はおそらく寄生原動物が進化の狭間にあって、特有の進化の道を歩み、古代の制御系を保存しえた為であろうと考えられる。これらの発見は、「制御システムの進化」といった、生物学の新しい分野の研究に、大きなインパクトを与えるものである。*P. carinii* の分子生物学からも、これに関連する新しい発見がもたらされ

ることを期待したい。

本研究に共同研究者として協力いただいた、田辺清勝、渡辺純一、高崎誠一、木幡陽、木村哲、岡慎一、島田馨、斉藤美智子、江川滉二、堀寛、芹川忠夫、山田淳三、角尾肇の諸博士にお礼申し上げる。

#### 文 献

- 1) Chagas, C. (1909) : Nova tripanozomiaza humana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 1, 159-218.
- 2) Edman, J. C., Kovacs, J. A., Masur, H., Santi, D. V., Elwood, H. J. and Sogin, M. L. (1988) : Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the Fungi. Nature, 334, 519-522.
- 3) Frenkel, J. K., Good, J. T. and Schultz, J. A. (1966) : Latent *Pneumocystis carinii* infection of rats, relapse, and chemotherapy. Lab. Invest., 15, 1559-1577.
- 4) Ivady, G., Paldy, L., Koltay, M., Tuth, G. and Unger, G. (1967) : *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet, 1, 616-617.
- 5) Kitada, K., Oka, S., Kimura, S., Shimada, K., Serikawa, T., Yamada, J., Tsunoo, H., Egawa, K., Nakamura, Y. (1991) : Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction : animal models and chinal application to noninvasive specimens. J. Clin. Microbiol, 29, 1985-1990.
- 6) Kovacs, J. A., Valerie, L. N. G., Masur, H. et al. (1988) : Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia : Improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. N. Engl. J. Med. 318, 589-593.
- 7) Pifer, L. L., Hughes, W. T. and Murphy, M. J. (1977) : Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro. Pediatr. Res., 11, 305-316.
- 8) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985) : Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230, 1350-1354.
- 9) Selik, R. M., Starcher, E. T. and Curran, J. W. (1987) : Opportunistic diseases reported in AIDS patients : frequencies, associations, and trends. AIDS, 1, 175-182.
- 10) Specht, T., Wolters, J. and Erdmann, V. A. (1990) : Compilation of 5S rRNA and 5S rRNA gene sequences. Nucleic Acids Res., 18 (suppl), 2215-2230.
- 11) Tanabe, K., Fuchimoto, M., Egawa, K. and Nakamura, Y. (1988) Use of *Pneumocystis carinii* genomic DNA clones for DNA hybridization analysis of infected human lungs. J. Infect. Dis., 157, 593-596.
- 12) Tanabe, K., Takasaki, S., Watanabe, J., Kobata, A., Egawa, K. and Nakamura, Y. (1989) : Glycoproteins composed of major surface immunodeterminants of *Pneumocystis carinii*. Infect. Immun. 57, 1363-1368.
- 13) Telzak, E. E., Cote, R. J., Gold, J. W. M., Campbell, S. W. and Armstrong, D. (1990) : Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections. Rev. Infect. Dis., 12, 380-386.
- 14) Watanabe, J., Hori, H., Tanabe, K. and Nakamura, Y. (1989) : Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the 'Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group' indicated by comparison of 5S ribosomal RNA sequences. Mol. Biochem. Parasitol., 32, 163-168.
- 15) Yoshida, Y. (1989) Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. J. Protozool., 36, 53-60.