カリニ肺炎菌の分子生物学と分子系統†

中 村 義 一

(東京大学医科学研究所)

カリニ肺炎菌 *Pneumocystis carinii* は、典型的な日和見感染病原体で、AIDS 患者や腎移植患者のような immunocompromised host に対し、重篤な肺炎を発症させる。とくに、AIDS 患者においては3分の2の症例でカリニ肺炎が合併しており、死因の第1位を占めている⁽¹⁾。米国では、1981~1988年の8年間に、52,000人のAIDS患者がカリニ肺炎を併発し、さらに1991年までの3年間で15万人が発症した。一方、本邦においても、AIDS患者の拡大に加えて移植医療の普及に伴い、確実にカリニ肺炎の症例が増加している⁽²⁾。

P. carinii は1912年 Delanoe 夫妻による新種記載から約40年を経た後に、虚弱乳幼児の肺炎で検出されて肺炎の起炎菌であることが明らかになった。*P. carinii* によって引き起こされるカリニ肺炎は免疫力の正常なヒトでは潜在感染してもほとんど発症しないため、従来症例数の少ない疾患であった。そのため、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⁽³⁾、抗 Pc 薬であるペンタミジンの発見⁽⁴⁾、一過的な *in vitro* 培養の報告⁽⁵⁾などが行われたものの、大きく研究が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の流行に伴ってカリニ肺炎の発症が急増し、その診断・治療・予防法の確立が緊急な問題となった。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。*P. carinii* の *in vitro* 培養法がいまだ確立されていないことが研究推進の最大の障壁となっているものの、分子生物学の導入により *P. carinii* に関する基礎的知見がようやく集積されつつある。

1. *P. carinii* の分子系統

P. carinii は大きさが数 μm の真核微生物である。増

殖状態では単細胞からなる栄養体を形成し、休止状態では8個の小芽体からなる嚢子を形成する生活環を持つ。

この形態学的研究と薬剤感受性特性とに基づいて、分類学的には原虫説と真菌説とが対峙してきた。近年、情報高分子の置換速度を指標とした分子時計が系統樹作成に利用されるようになり、*P. carinii* においても分類学的位置を明確にする目的でリボソーム RNA (rRNA) またはリボソーム DNA (rDNA) の塩基配列が決定され、生物種間で比較されるようになった。われわれのグループ⁽⁶⁾は5S rRNAを、またEdmanら⁽⁷⁾は18S rDNAの塩基配列をほぼ同時期に決定し、ともに原虫より真菌に近縁とする結果を示した。図1は、決定した *P. carinii* の5S rRNAの塩基配列を他のすべての配列とコンピュータを使って比較して分子系統樹上での位置を計算した結果である。その結果、*P. carinii* は Protista Fungi に属し、アメーバや粘菌類 (Myxomycota)、接合菌類 (Zygomycota) に近い仲間であることが示され、詳細にはいわゆる真菌である子囊菌類や担子菌類より接合菌類に近いという結果を示す。これに対し、5.8Sと18S rRNA 系統樹では、子囊菌類である酵母に最も近縁であった。その他の遺伝的証拠も *P. carinii* が原虫より菌類に近縁であることを支持している。

カリニ肺炎は *P. carinii* の培養ができないため、診断を培養にのみ頼りがちな呼吸器感染症のなかにあって、最も診断の困難な疾患とされてきた。そのため、われわれ⁽⁸⁾は5S rRNAの分子系統解析の結果をPCR (Polymerase Chain Reaction) DNA増幅法に適用して、高感度なカリニ肺炎診断法を開発した。PCRを診断に利用する場合、最も重要になるのがプライマーの選択である。*P. carinii* 由来のDNAにのみ反応し他種生物のDNAとは交差しないプライマーを選ばなくてはならない。その点、5S rRNAについては現在すでに800種類の塩基配列が決定され最も広範な分子系統解析が行われているため、プライマーの比較検討が可能であった。

† Molecular Biology and Phylogeny of *Pneumocystis carinii*.

Yoshikazu NAKAMURA (Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo 113)

図1 5S rRNA の類似性マトリックスにおける *P. carinii* の分子系統学的位置. 近傍の 95 種類の生物種の 5S rRNA の塩基配列を相互比較し, 似た順に配列して, 色の濃淡でその類似度を表示してある. 濃い色の三角形の領域が類縁グループを意味する⁽⁶⁾.

	'5S sense' primer (20 mer)	'5S antisense' primer (20 mer)
<i>P. carinii</i>	5' A-G-UUACGGCCAUAACCUCAGA	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. inundatus</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.....GUG·G·U	·GAGUAGG·CA·C·CAGG--U
<i>M. lysodeikticus</i>	GUC·GG.....G·GUG·G	·GAGUAGGUC·C·C·GACA·

図2 分子系統解析の PCR 診断への応用. PCR プライマーに用いる *P. carinii* の 5S 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.

その結果, 図2に示すように 5S rRNA の両端 20 塩基をプライマーに選択すれば, *P. carinii* 近縁種や病原性真菌, および上気道常在細菌とは理論的に交差反応を起こさないことがわかった. 具体的に, モデル動物実験と臨床試験によりその特異性と有効性を確認し, 実用的な PCR 診断法としての改良を加えて臨床的に確立するに

至った⁽⁹⁾. この方法は, わずか数個の Pc 細胞でも簡便な DNA 染色のみで検出可能な高い検出感度を持ち, ごく早期におけるカリニ肺炎の診断を可能にした. 従来のグロコット染色法によるカリニ肺炎の診断には, 大量の虫体を含む肺胞気管支洗浄液や経皮的肺吸引を使わざるをえなく, 患者に対する侵襲のみならず, AIDS 患者に

においては、医師側の HIV 接触の危険性も問題視されていた。このリスクを回避する意味から、喀痰を材料にした臨床診断が有効である。

2. *P. carinii* の分子生物学

P. carinii のゲノム DNA ライブラリーは 1988 年にわれわれ⁽¹⁰⁾が報告したものが最初で、その後、欧米の数研究室から報告が続いた。この 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ての報告という意義を持つものであった。現在、trimethoprim と sulfamethoxazole の ST 合剤が治療薬の 1 つとして使用されていることから、核酸合成系に関連した thymidylate synthase と dihydrofolate reductase (DHFR) の遺伝子構造は最も早く 1989 年に明らかにされた^(11,12)。DHFR 遺伝子は、trimethoprim が *P. carinii* の DHFR の弱い阻害剤であることから、*P. carinii* の発現ライブラリーより、インサートによる大腸菌のトリメトプリム抵抗性を利用してスクリーニングされた。その他、 β -tubulin や真菌のみが持つ elongation factor 3 等の遺伝子もクローニングされている。明らかにされた *P. carinii* の遺伝子は、コード領域で AT 含量が 60~70% と高く、とくにコドン 3 番目の塩基に

は AT が多い。非コード領域を含めると AT 含量はさらに高くなる。また、*P. carinii* のゲノム遺伝子はイントロンを持つことも判明した。

現在、*P. carinii* の病原性および細胞生物学的視点から細胞表面抗原の研究に国際的な関心が集まっている。細胞表面上には、われわれ⁽¹³⁾が P 115 と命名した分子量 105~120 kDa の糖タンパク質が多量に発現しており、強い抗原性を持っている。実に、細胞総タンパク質の 70% あまりを占める。最近の研究は、カリニ肺炎からの回復に必要な T 細胞応答が P 115 糖タンパク質に対して起こっていることを示しており、本分子が宿主免疫機構の標的として重要な分子であることは間違いない。P 115 抗原の糖鎖分析の結果、その主要成分はマンノースであり⁽¹³⁾、これが宿主側の第 1 次防御に働く肺胞マクロファージのマンノース・レセプターにより認識され攻撃されると考えられる⁽¹⁴⁾。P 115 糖タンパク質を 2 次元電気泳動で分析すると、抗原性は共有するが等電点的に異なる複数のアイソフォームに分離する。この多型性は糖鎖修飾の違いに部分的に起因している。

われわれ⁽¹⁵⁾を含めた複数の研究グループが、ここ数年間 P 115 遺伝子のクローニングにしのぎを削ってきた。

図 3 *P. carinii* 主要表面糖タンパク質 P 115 遺伝子ファミリーとクラスター形成。(a) P 115-cDNA をプローブとする *P. carinii* 染色体 DNA のサザン分析の結果。(b) DHFR 遺伝子をプローブとする *P. carinii* 染色体 DNA のサザン分析の結果。(c) d で示す DOWN および UP プライマーを用いた染色体 P 115 遺伝子間配列の PCR 増幅の結果。レーン 1, サイズマーカー; レーン 2, *P. carinii* 総 DNA; レーン 3~6, 染色体 P 115 遺伝子の分離クローン。(d) 予想される P 115 遺伝子のタンデム・クラスター。

このクローニングの困難さは P 115 分子の糖鎖部分が強い抗原性を持つために、よい抗ペプチド性抗体が作製できなかったことによる。しかし、ようやく最近、われわれ⁽¹⁶⁾の研究室で *P. carinii* の cDNA 発現ライブラリーから P 115-cDNA の分離に成功した。完全な P 115-cDNA のアミノ酸長は 1076 で、構造が特定された P 115 分子種の分子量は 120,688 Da である。この完全長の P 115-cDNA クローニングには予想もしなかった困難があった。それは、cDNA 構造が多型で、しかもその多型性がきわめて高いことがクローニングの過程で明らかになったことである。これまでに 100 種以上の cDNA クローン塩基配列分析し、数 10 種に及ぶ多型性を観察している。この P 115 ファミリーのメンバーには相互に約 70% 程度のアミノ酸配列の相同性がある。さらに、P 115-cDNA の多型は転写後の RNA 加工により生じるのではなく、ゲノム構造に潜在的にコードされている。しかも、約 10 数個識別できるカリニ染色体のほぼすべてに P 115 遺伝子クラスターを形成することが明らかになってきた。図 3 は染色体 P 115 遺伝子ファミリーの DNA サザン分析と、タンデムクラスターを検出した PCR 分析の結果を示す⁽¹⁶⁾。さらに、コンピュータ検索の結果、P 115 タンパク質はトロポミオシンやミオシンに高い相同性を示した。このことは、P 115 分子が細胞外膜を貫通して内膜細胞骨格と相互作用する可能性を示唆し、これが事実ならば、P 115 糖タンパク質は機能的に外界の免疫環境をセンスしてカリニ細胞が増殖へ向かう過程のシグナル伝達に機能していることが予想される。

P. carinii の P 115 多型性の生理的意義は、この分子の免疫学的な重要性からみて非常に興味深い。トリパノソーマ、マラリア、*Borrelia* では、表面抗原を変化させることにより宿主の免疫機構を回避していることが知られており、その分子機構が精力的に研究されている。*P. carinii* が免疫力の低下した宿主でのみ増殖しうることを考えると、*P. carinii* の場合は免疫機構回避が必要かどうか明らかでないが、もし P 115 遺伝子の遺伝学的多型が *P. carinii* の優先的な免疫回避のための表面抗原変換を反映するものであるならば、これが AIDS の深刻な合併症である事実からも、その意味するところはきわめて重大である。また、*Neisseria* の Pilin タンパク質も変異するが、このタンパク質は宿主の上皮細胞への付着に働いており、変異にともなって抗原性と機能の両方

が影響を受けている。最近、P 115 分子がフィブロネクチンを介して上皮細胞付着に働くことが報告されており、この一致も興味深い。以上のような視点から、*P. carinii* の主要表面抗原 P 115 遺伝子の遺伝的多型は、*P. carinii* の molecular pathobiology の根幹にかかわる重要な発見であるとわれわれは考えており、それら多型遺伝子産物の機能・構造、および発現調節機構に関する研究が、今後、生物学的にも臨床的にも大きなインパクトを持つ研究へ発展するものと確信する。

- (1) R. M. Selik, E. T. Starcher, and J. W. Curran : *AIDS*, **1**, 175—182 (1987).
- (2) Y. Yoshida, T. Shiota, M. Yamada, H. Yoshikawa, T. Tegoshi, T. Ikai, and K. Ogino : *J. Protozool.*, **36**, 78 S—80 S (1989).
- (3) J. K. Frenkel, J. T. Good, and J. A. Schults : *Lab. Invest.*, **15**, 1559—1577 (1966).
- (4) G. Ivady, L. Paldy, M. Koltay, G. Tuth, and G. Unger : *Lancet*, **1**, 616—617 (1967).
- (5) L. L. Pifer, W. T. Hughes, and M. J. Murphy : *Pediatr. Res.*, **11**, 305—316 (1977).
- (6) J. Watanabe, H. Hori, K. Tanabe, and Y. Nakamura : *Mol. Biochem. Parasitol.*, **32**, 163—168 (1989).
- (7) J. C. Edman, J. A. Kovac, H. Masur, D. V. Santi, and M. L. Sogin : *Nature*, **334**, 519—522 (1988).
- (8) K. Kitada, S. Oka, S. Kimura, K. Shimada, T. Serikawa, J. Yamada, H. Tsunoo, K. Egawa, and Y. Nakamura : *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1985—1990 (1991).
- (9) Y. Nakamura : in “Diagnostic Molecular Microbiology,” ed. by D. H. Persing, F. Tenover, T. J. White, and T. F. Smith, The American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1993, pp. 437—440.
- (10) K. Tanabe, M. Fuchimoto, K. Egawa, and Y. Nakamura : *J. Infect. Dis.*, **157**, 593—596 (1988).
- (11) U. Edman, J. C. Edman, B. Lundgren, and D. V. Santi : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6503—6507 (1989).
- (12) J. C. Edman, U. Edman, M. Cao, B. Lundgren, J. A. Kovac, and D. V. Santi : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 8625—8629 (1989).
- (13) K. Tanabe, S. Takasaki, J. Watanabe, A. Kobata, K. Egawa, and Y. Nakamura : *Infect. Immun.*, **57**, 1363—1368 (1989).
- (14) R. A. B. Ezekowitz, D. J. Williams, H. Koziel, M. Y. K. Armstrong, A. Warner, F. F. Richard, and R. M. Rose : *Nature*, **351**, 155—158 (1991).

- (15) Y. Nakamura, K. Kitada, M. Wada, and M. Saito : *J. Protozool.*, **38**, 3 S—4 S (1991).
- (16) M. Wada, K. Kitada, M. Saito, K. Egawa,

and Y. Nakamura : *J. Infect. Dis.* **168**, 979—985 (1993).