

Naegleria fowleri 総タンパク質の部分アミノ酸配列解析と未同定タンパク質の
遺伝子解析 -2D-PAGE データベースの拡充を目指して

小村 麻子, 泉山 信司, 八木田 健司, 下河原 理江子

遠藤 卓郎 (国立感染症研究所・寄生動物部)

Amino acid sequence analysis and molecular cloning of *Naegleria fowleri* proteins

Mako OMURA, Shinji IZUMIYAMA, Kenji YAGITA, Rieko SHIMOGAWARA and Takuro ENDO

(Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Japan.

Toyama 1-23-1, Shinjuku, Tokyo)

SUMMARY

Naegleria fowleri is a thermophilic free-living amoeba that causes primary amoebic encephalitis (PAM) in humans, while *N. lovaniensis*, the morphologically identical species, is not. A two-dimensional (2-D) gel analysis was employed to compare total proteins in *N. fowleri* to those of *N. lovaniensis* in order to identify proteins that may link to its pathogenesis. Until now we have detected 63 protein spots in *N. fowleri* by means of N-terminal and/or internal amino acid sequences analyses. Due to lacking in the available genetic data of DNA of *N. fowleri*, it is sometime difficult to link information from the proteome analyses with information on DNA. In the present experiment, we partially cloned the genes of 2 protein spots, tentatively designated as #15(24.1kDa, pI6.5) and #35 (50.9 kDa, pI 16.7), that are specific to *N. fowleri* by means of degenerate PCR. The respective PCR products had approximately 250 bp and 400 bp in sizes. From the amino acid sequence predicted from the amplified DNA, #15 was identified with high confidence as thioredoxin peroxidase (22.3 kDa, Q6DV14) with 80% (54/67) homology. Similarly the predicted amino acid sequence of #35 showed 55% (67/120) homology to that of glutamate dehydrogenase (55.0kDa, Q54KB7).

[目的] 本研究では強い病原性を持つ *Naegleria fowleri* と非病原性の *N. lovaniensis* の総タンパク質の差異について、2D-PAGE による検討を行ってきた(1)。2種それぞれ複数の株を用いた解析を行ったことから種特異的あるいは2種間共通なタンパク質を選択できるようになった。この情報をもとに *N. fowleri* NF66株より63個のタンパクスポットについて、N末端および中間アミノ酸配列解析やMS/MS解析を行い、こ

れまでに14個が同定できた。得られた情報から *N. fowleri* 2D-PAGE データベースを構築し、現在もデータの拡充を進めている。一方で *Naegleria* 属アメーバの核酸情報は多くなく、プロテオームのみによるタンパク質の同定には限界がある。特に2D-PAGE 解析により *N. fowleri* 特異的と認められたタンパクスポットの多くが未同定のままである。今回は部分アミノ酸配列情報を得ている未同定タンパク質について、

degenerate PCR 法による部分遺伝子のクローニングを行い、塩基配列情報からタンパク質の推定を試みた。

[材料と方法] これまでの2D-PAGE 解析(1)により *N. fowleri* 特異的であったスポット31個のうち、N 末端および中間アミノ酸配列情報を得ている No.15 (24.1 kDa, pI 6.5), No.35 (50.9 kDa, pI 6.7) の2個をクローニングの対象とした。N 末端側を forward、中間配列を reverse として、20残基前後のアミノ酸配列情報から、それぞれ17~20mer 程度の degenerate primer を各3本程度設計した。*N. fowleri* Nf66株のゲノム DNA を鋳型として、複数の primer の組合せを用いた nested PCR を行った。片側プライマーのみを用いた陰性対照との比較から、目的の DNA 断片を確認した。得られた DNA 断片を pBluescript SK(+) phagemid (Stratagene 社) の EcoRV サイトに BKL キット (タカラバイオ社) を用いて導入した。形質転換後にユニバーサルプライマーを用いてコロニー PCR を行ない、目的の断片が導入されたクローンから5個を選択して直接塩基配列決定を行なった。得られた塩基配列と推定アミノ酸配列を用いて BLAST による相同性検索を行った。

[結果と考察] クローニングを試みたスポット2個 No.15 および No.35 についてそれぞれ約250 bp、約400 bp の塩基配列を得た。いずれの配列にも primer

設計に使用した元のアミノ酸配列情報を含むことを確認した。これらのスポットは部分アミノ酸配列によるタンパク質の推測が行えなかったが、今回得た推定アミノ酸配列を加えて相同性検索を行ったところ、No.15は Thioredoxin peroxidase (22.3 kDa、54/67 残基一致 (80%、Q6DV14))、No.35は Glutamate dehydrogenase (55.0 kDa、67/120 残基一致 (55%、Q54KB7)) と高い相同性を持つことが明らかとなった。2つのタンパク質はすでに他の生物では isoenzyme の存在やその機能の違いについて報告がなされており (2,3) 、生物に広く保存されていることが知られている。これらは *N. lovaniensis* にも存在すると予想され、実際 No.15および No.35と近接した位置にそれぞれのスポットが存在することを確認した。しかし2D-PAGE 画像解析では、わずかな差異で2種間において非共通スポットとして確認し、さらに No.15 に対応する *N. lovaniensis* のスポットの N 末端アミノ酸配列は *N. fowleri* とは異なっていた。2種間におけるこれらのスポットの関連性の有無と機能の差異に興味を持たれる。

[文献]

- 1) Omura, M. et al., Jpn. J. Protozool. (2005) 38, No.1:24-25.
- 2) Fang J. et al., J. Biochem. Chem. (2005) 280, 25284-25290.
- 3) Burki F. et al., Nat. Genet. (2004) 36 (10): 1061-1063.