

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学フォーラム (2014.02) 14巻1号:2~12.

エキノコックス幼虫のカテプシン様システインペプチダーゼ

迫 康仁、伊藤 亮

## 依頼論文

# エキノкокクス幼虫のカテプシン様システインペプチダーゼ

迫 康 仁\* 伊 藤 亮\*

### 【要 旨】

多包条虫 *Echinococcus multilocularis* の幼虫感染に起因するエキノкокクス症（多包虫症）は、北半球に広く分布している人獣共通寄生虫症であり、日本では北海道で流行している。エキノкокクス幼虫は、ヒト体内で数十年にわたり寄生することが出来るが、その生存メカニズムは殆ど不明である。原虫、吸虫、線虫の研究により、寄生虫のペプチダーゼ、特にシステインペプチダーゼは、寄生虫の生存戦略に関与し、その病原性の発現に深く関与していることが明らかとなっている。しかしながら、エキノкокクスが属する条虫に関しては、その知見が殆どなく、まさに無視された研究領域であった。本稿では、著者らが明らかにしたエキノкокクス幼虫カテプシン L 様ならびにカテプシン B 様システインペプチダーゼの酵素学的な特徴について紹介したい。

**キーワード** エキノкокクス幼虫、カテプシン L 様、カテプシン B 様、組換え酵素、酵素性状

## 1. はじめに

四類感染症の一つであるエキノкокクス症は、条虫類である多包条虫 *Echinococcus multilocularis* の幼虫ステージである包虫の寄生に起因する疾患であり、新興・再興感染症として重要である。現在日本では、その分布は北海道にほぼ限局されているが、本州への拡大が懸念されている。また、世界的にも多包条虫の拡大傾向が報告されている<sup>1)</sup>。好発部位は肝臓が最も多く、ほかに肺、脳、骨髄などにも寄生する。ヒトへの感染は、多包条虫の虫卵（六鉤幼虫）を偶発的に経口摂取することにより成立する。六鉤幼虫は門脈を經由し各組織に生着した後、無性生殖的に小嚢胞を形成しながら増殖（腫瘍様病変）し、各器官の機能障害を引き起こす<sup>2)</sup>。

臨床症状は通常感染後約 10 年経過しないと、ほとんど出現しない。早期、特に無症状期、の確定診断や治療は、予後の観点から見た場合とても重要である。患者の約 1/3 は胆汁うっ滞性黄疸を発症し、約 1/3 は心窩部痛を訴える。残りの患者は、疲労、体重減少、

肝肥大などの症状の診察の際に見つかる<sup>3)</sup>。

本症の根治的な治療法は外科的処置により病巣を完全に摘出すること以外無い。完全に摘出が出来なかった場合、包虫組織は増殖を継続し再発する。術後や手術が不可能な場合は、寄生虫細胞の微小管形成阻害剤であり、エキノкокクス幼虫の増殖抑制作用があるベンジミダゾール系製剤（アルペンダゾール、メベンダゾール）を用いた化学療法が適用される。しかしながら、化学療法剤の効果は一定ではなく、かつ寄生虫の殺滅作用も観察されないため、根治治療剤としては期待できず、新たな化学療法剤の開発が急務となっている<sup>3)</sup>。

ペプチダーゼ（タンパク質分解酵素、ペプチド結合加水分解酵素）は、寄生虫の、病原性、宿主免疫応答からの回避、必須栄養の取り込み、宿主組織への侵入、などに関与する極めて重要な分子である<sup>4)</sup>。ペプチダーゼは、触媒機構の違いにより、システインペプチダーゼ、セリンペプチダーゼ、アスパラギン酸ペプチダーゼ、金属ペプチダーゼ、スレオニンペプチダーゼ、グルタミン酸ペプチダーゼに分類される。その内、蠕

\*旭川医科大学 寄生虫学講座

虫では、システインペプチダーゼが特に重要であると考えられている<sup>4-6)</sup>。

蠕虫では、吸虫である肝蛭 *Fasciola hepatica*、ウエステルマン肺吸虫 *Paragonimus westermani*、マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni*、線虫である胃捻転虫 *Haemonchus contortus*、で盛んに解析が行われている。肝蛭システインペプチダーゼは、コラーゲン<sup>7)</sup>、イムノグロブリン<sup>8)</sup>、キニノーゲン<sup>9)</sup>を分解すること、また、ヒトやヒツジ T 細胞上の CD4 分子を分解し T 細胞としての機能を消失させること<sup>10)</sup>が報告されている。ウエステルマン肺吸虫のシステインペプチダーゼは、イムノグロブリンを分解すること<sup>11)</sup>、また、好酸球に作用し脱顆粒反応を促進することにより、好酸球の機能を破壊し、炎症反応を低下させていること<sup>12)</sup>が報告されている。マンソン住血吸虫や胃捻転虫では、その栄養源である赤血球ヘモグロビンのシステインペプチダーゼによる分解が報告されている<sup>13-15)</sup>。この様にシステインペプチダーゼは寄生虫が生存するために極めて重要な役割を担っていることから、化学療法剤の標的分子やワクチン候補抗原と考えられている<sup>16-19)</sup>。

エキノコックス幼虫はヒト体内で数十年以上も生存している。したがって、エキノコックス幼虫のペプチダーゼも、宿主免疫回避や栄養取込みの観点より、重要であると推察される。しかしながら、エキノコックス幼虫の詳細なペプチダーゼの解析が行われていなかった。なぜなら、宿主組織内で胚層細胞の外生出芽により浸潤しながら発育、増殖するため<sup>20)</sup>、実験動物より摘出した寄生虫組織内には多数の宿主細胞が混在しており、高品質な寄生虫材料を調整が困難であったためである。そこで、著者は、エキノコックス幼虫システインペプチダーゼの遺伝子をクローニングした後、組換え酵素を発現させ、その酵素学的な性状の解析を行った<sup>21, 22)</sup>。本稿では、その特徴について紹介したい。

## 2. エキノコックス幼虫カテプシン L 様システインペプチダーゼ：EmCLP1 および EmCLP2

### 1) EmCLP1, EmCLP2 遺伝子のクローニング及び一次構造

真核生物ペプチダーゼの活性中心の構造は高度に保存されているため、そのアミノ酸配列を基にした縮

合プライマーを用いた PCR 法により、その遺伝子をクローニングできる<sup>23)</sup>。システインペプチダーゼには、QGQCGSCW ならびに YWIVKNSW のアミノ酸配列が保存されている。そこで、その配列より設計したプライマーを用い、エキノコックス幼虫 cDNA より、システインペプチダーゼの一部分をクローニングした。その後、それをプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、最終的に 2 種類のシステインペプチダーゼのクローニングに成功した。塩基配列解析の結果、両システインペプチダーゼはリソソームカテプシンペプチダーゼであるカテプシン L の相同分子である事が判明し、それらを EmCLP1 ならびに EmCLP2 と名付けた<sup>21)</sup>。

それらの一次構造より予測される基質結合部位、特に基質特異性を決定する S2 ポケット (図 1)、を構成するアミノ酸残基は興味深いものであった。システインペプチダーゼの S2 ポケットの形成には、結晶構造解析より、67、68、133、157、160 および 205 番目 (プロセッシング後の成熟パパインのアミノ酸番号に対応) のアミノ酸残基が関与していることが明らかとなっている<sup>24, 25)</sup>。カテプシン L では、67 番目のアミノ酸残基 (S3 ポケットに近接) は、通常ロイシンのような疎水性アミノ酸が存在する。しかしながら、EmCLP1 では、その位置に親水性かつ負荷電を持つアスパラギン酸が存在していた (表 1)。このような荷電したアミノ酸が基質結合部に存在しているシステインペプチダーゼとして、イヌ回虫カテプシン L 様ペプチダーゼ<sup>26)</sup>、マウスおよびラットのカテプシン R<sup>27, 28)</sup>のみが知られており、ヒトでは知られていない。S2 ポケットに於けるアスパラギン酸の役割については、未だ不明である。しかし、カテプシン R の立体構造予測より、S3 ポケットに近接するアスパラギン酸が

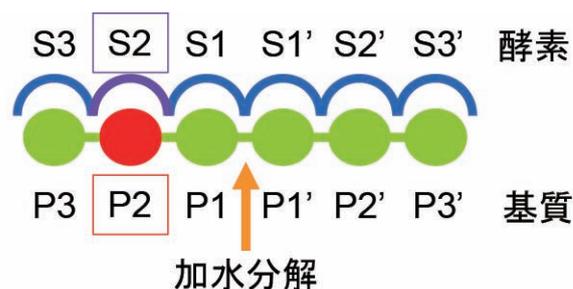


図 1 酵素の S 2 ポケットが基質特異性に関与する

表 1 S2 ポケットを構成するアミノ酸残基

Residues <sup>a</sup>	Papain	EmCLP1 <sup>b</sup>	EmCLP2 <sup>b</sup>	Human cathepsin L	Human cathepsin K
67	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Tyr
68	Pro	Met	Met	Met	Met
133	Val	Ala	Ala	Ala	Ala
157	Val	Leu	Leu	Leu	Leu
160	Ala	Ala	Gly	Gly	Ala
205	Ser	Met	Leu	Leu	Leu

<sup>a</sup>パパインのアミノ酸残基番号  
<sup>b</sup>McGrath の報告<sup>24)</sup>に従い推定した

タンパク質の N 末端のアミノ基の認識を可能にし、dipeptidyl aminopeptidase (タンパク質の N 末端より 2 アミノ酸残基ずつ切断する活性を持つ) としての活性を持つ可能性が示唆されている<sup>27)</sup>。一方、EmCLP2 では、S2 ポケットを構成するアミノ酸残基は、カテプシン L のそれらよりは、カテプシン K のそれらに類似していた。これらの差異より、EmCLP1 および EmCLP2 に寄生虫特有の酵素活性が存在する可能性が示唆された。

2) EmCLP1,EmCLP2 の発現と局在

EmCLP1 および EmCLP2 に対するモノクローナル抗体を用いて、エキノコックス幼虫抽出抗原および分泌・排泄液に対してイムノブロット解析を行った。その結果、両酵素が蛋白質レベルで発現していること、また、一部が分泌されていることが明らかとなった。興味深いことに、TritonX-114 相分離法により膜蛋白質画分を調製しイムノブロット解析をしたところ、EmCLP2 が検出され、その一部が寄生虫細胞膜に結合している可能性が示唆された。

エキノコックス幼虫での局在を解析するために、免疫組織染色を行った。その結果、両酵素とも胚層、繁殖胞および原頭節で発現していることが確認できた。EmCLP1 に関しては、原頭節での発現は確認できたが、

その染色性は他の部位に比してかなり弱いものであった。

3) EmCLP1,EmCLP2 の酵素学的性状

EmCLP1 ならびに EmCLP2 の酵素学的性状を解析するためには、ジスルフィド結合を介した正常な立体構造の構築が必要なため、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 株を用いた発現系で組換え酵素を調製した。組換え酵素を精製した後、まずは、弱酸性下 (pH 5.0) で複数の合成ペプチド基質 Z-P3-P2-P1-MCA (P1~P3 は任意のアミノ酸、P3 を欠く基質もある) を用いて基質特異性について解析した (図 3)。前述したように、システインペプチダーゼの基質特異性は、その S2 ポケットに結合するアミノ酸により規定される。つまり、それに結合する基質部である P2 部に異なるアミノ酸残基を持つ基質を用いることで、基質特異性を解析することが出来る。その結果、両酵素とも Z-Leu-Arg-MCA (カテプシン K/S/V の基質) および Z-Phe-Arg-MCA (カテプシン B/L の基質) に対して分解活性を示した。また、EmCLP1 は Z-Val-Val-Arg-MCA (カテプシン S/L の基質) や Z-Arg-Arg-MCA (カテプシン B の基質) に対しても弱い水解

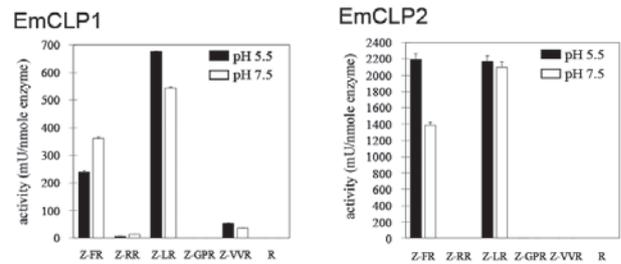


図 3 EmCLP1 および EmCLP2 の基質特異性

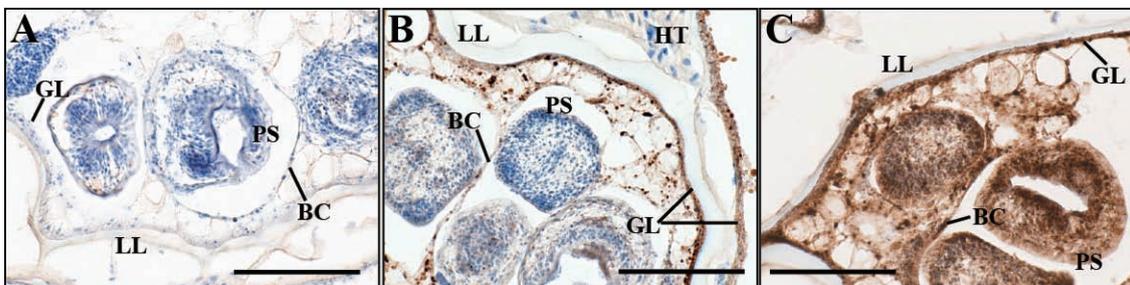


図 2 EmCLP1 および EmCLP2 の局在

A, 陰性コントロール ; B, EmCLP1 ; C, EmCLP2  
PS, 原頭節 ; GL, 胚層 ; BC, 繁殖胞 ; LL, 角皮層 ; HT, 宿主組織  
Scale bar=100µm

活性を持っていた。哺乳類カテプシン L は、Z-Phe-Arg-MCA に対する水解活性を最も強く示し、次に Z-Leu-Arg-MCA に対して水解活性を示す。しかしながら、EmCLP1 および EmCLP2 は Z-Leu-Arg-MCA に対してより強い水解活性を示した。以上のことより、EmCLP1 および EmCLP2 は、一次構造上はカテプシン L に類似しているが、基質特異性に関しては、カテプシン S/K に類似している事が示唆された。

EmCLP1 および EmCLP2 の Z-Phe-Arg-MCA に対する至適 pH の解析を擬一時反応条件下（反応中の基質濃度が、酵素のその基質  $K_m$  値よりも十分低い）で行ったところ、それぞれの至適 pH は 5.0 および 6.0 であった。しかしながら、中性領域を含む広範な pH で水解活性を示していた。EmCLP1 および EmCLP2 は、イムノブロット解析より、エキノコックス幼虫内とともに、幼虫外に分泌されていることが明らかとなっていることや、中性領域でも酵素活性を有していることより、ライソゾーム酵素としてだけではなく、細胞外酵素としての機能も持っていることが示唆された。ただし、中性領域での安定性に関する解析によるさらなる裏付けが必要である。

4) EmCLP1, EmCLP2 によるタンパク質分解活性

EmCLP1 ならびに EmCLP2 のタンパク質分解活性に関して、液性分子基質としてヒトイムノグロブリン G およびウシ血清アルブミン、また、細胞外マトリックス分子基質として I 型および IV 型コラーゲン、フィブロネクチンを用いて解析を行った。その結果、EmCLP1 および EmCLP2 は全ての基質を分化する活

性を有していること、その分解活性は、弱酸性下の方が高い傾向にあることが明らかとなった。

哺乳類のカテプシン L は I 型コラーゲンの非螺旋性であるトリペプチド部のみを切断でき、3 重螺旋領域を切断できない<sup>29)</sup>。つまり、I 型コラーゲンを細かく切断するとはできない。それに対し、EmCLP1 ならびに EmCLP2 は I 型コラーゲンの 3 重螺旋構造領域を細断していた。この様な、分解活性を示す哺乳類カテプシンとして、破骨細胞で産生され分泌されているカテプシン K が知られている。I 型コラーゲンはプロリンの割合が高く、カテプシン K はそのプロリンを S2 ポケットで認識し、切断していると示唆されている<sup>29)</sup>。EmCLP1 ならびに EmCLP2 は、プロリンを P2 部に持つ基質を切断することが出来なかったことより、カテプシン K とは異なる部位で、I 型コラーゲンを切断していると推察された。

3. エキノコックス幼虫カテプシン B 様システインペプチダーゼ : EmCBP1 および EmCBP2

1) EmCBP1, EmCBP2 遺伝子のクローニング及び一次構造

エキノコックス幼虫のシステインペプチダーゼに関する知見を増やすために、新規システインペプチダーゼのクローニングを試みた。方法は、エキノコックス幼虫カテプシン L 様ペプチダーゼと同様であるが、今回は、EmCLP1 および EmCLP2 の塩基配列情報を基に、活性中心の保存アミノ酸配列部の縮合プライマーを設計し、PCR に供した。予測されるサイズの PCR 産物をクローニングした後、48 クローンについて塩基配列を決定した。その結果、4 種類のシステインペプチダーゼをコードする遺伝子がクローニングされた。データベースを検索した結果、2 種類は EmCLP1 および EmCLP2 と同一で有り、他の 2 種類は新規の遺伝子であることが明らかとなった。全長を rapid amplification of cDNA ends (RACE) 方によりクロ

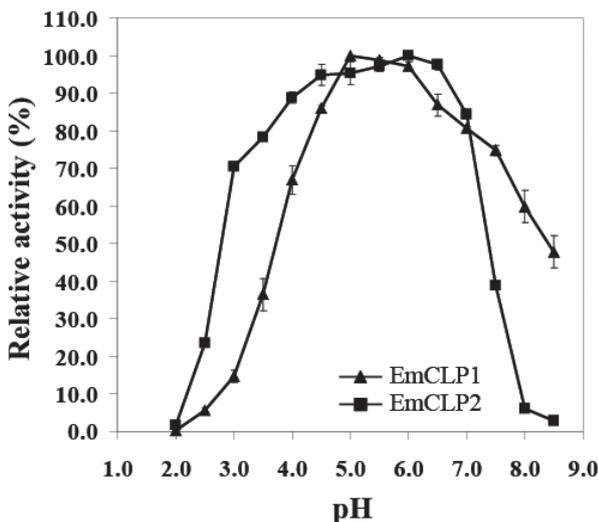


図4 EmCLP1 および EmCLP2 の pH プロファイル

表2 S 2 ポケットを構成するアミノ酸残基

Residues <sup>a</sup>	Human cathepsin B	EmCBP1 <sup>b</sup>	EmCBP2 <sup>b</sup>	SmCB1 <sup>b</sup>	SmCB2 <sup>b</sup>
76	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro
173	Ala	Asp	Asp	Ser	Asp
198	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
200	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
245	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp

<sup>a</sup>ヒトカテプシンBのアミノ酸残基番号  
<sup>b</sup>McGrathの報告<sup>24)</sup>に従い推定した

ーニングし、それらの塩基配列を解析したところ、両システインペプチダーゼはリソソームカテプシンペプチダーゼであるカテプシン B の相同分子である事が判明し、それらを EmCBP1 ならびに EmCBP2 と名付けた<sup>22)</sup>。

EmCBP1 および EmCBP2 には、活性中心のアミノ酸と共に、カテプシン B の特徴的構造であり、dipeptidyl carboxypeptidase 活性（タンパク質の C 末端より 2 アミノ酸残基ずつ切断する活性）を与えるオクルーディンググループ<sup>30)</sup>も保存されていた。また、カテプシン B の S2 ポケットの形成には、結晶構造解析より、76、173、198、200 および 245 番目（プロセッシング後のヒトカテプシン B のアミノ酸番号に対応）のアミノ酸残基が関与していることが明らかとなり<sup>24)</sup>、それらのアミノ酸残基は比較的種間で保存されている。EmCBP1 および EmCBP2 に特徴的な点として、ヒトやマウスなどのカテプシン B では、173 番目のアミノ酸残基は非極性のアラニンであるのに対し、EmCBP1 および EmCBP2 では親水性かつ負荷電を持つアスパラギン酸が存在している事が見出されたが、その基質特異性に関する役割については不明である。

## 2) EmCBP1,EmCBP2 の発現と局在

EmCBP1 および EmCBP2 に対するモノクローナル抗体を用いて、エキノコックス幼虫抽出抗原および分泌・排泄液に対してイムノブロット解析を行った。その結果、エキノコックス幼虫カテプシン L 様システインペプチダーゼ同様に、両酵素が蛋白質レベルで発現していること、また、一部が分泌されていることが明らかとなった。

エキノコックス幼虫での局在を解析するために、免疫組織染色を行った。その結果、両酵素とも胚層、繁殖胞および原頭節で発現していることが確認できた。これも、エキノコックス幼虫カテプシン L 様システインペプチダーゼと同様であった。

## 3) EmCBP1,EmCBP2 の酵素学的性状

酵母 *Pichia pastoris* を用いた発現系で発現させた組換え EmCBP1 ならびに組換え EmCBP2 の酵素学的性状の解析を行った。EmCBP1 は、Z-Phe-Arg-MCA > Z-Val-Val-Arg-MCA > Z-Leu-Arg-MCA の順で高分解活性を示した。また、Z-Gly-Pro-Arg-MCA（カテプシン K の基質）や Z-Arg-Arg-MCA（カテプシン B の基質）に対しても弱いながらも、分解活性を示した。同様な基質特異性を EmCBP2 も有していた（図 6）。EmCBP1 と EmCBP2 の基質特異性に関して特徴的な点として、カテプシン B 特異的基質である Z-Arg-Arg-MCA に対する水解活性の低さが挙げられる。Z-Phe-Arg-MCA と Z-Arg-Arg-MCA に対する酵素反応の速度定数 ( $k_{cat}/K_m$ )、すなわち分解しやすさ、を比較してみると、EmCBP1 では Z-Phe-Arg-MCA の速度定数が Z-Arg-Arg-MCA の速度定数の 93 倍であり、EmCBP2 では 137 倍であった。哺乳類カテプシン B では、速度定数比は 10 以下で有り、両基質に対してほぼ同程度の分解活性を示す事が知られている<sup>31)</sup>。EmCBP1 および EmCBP2 の一次構造で特徴的な点としては、S2 ポケットを構成する 173 番目のアミノ酸が、中性のアミノ酸残基ではなく親水性かつ負荷電性のアスパラギン酸である事が挙げられる。同様なアミノ酸残基を持つカテプシン B (SmCB2) がマンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* で報告されている。また、

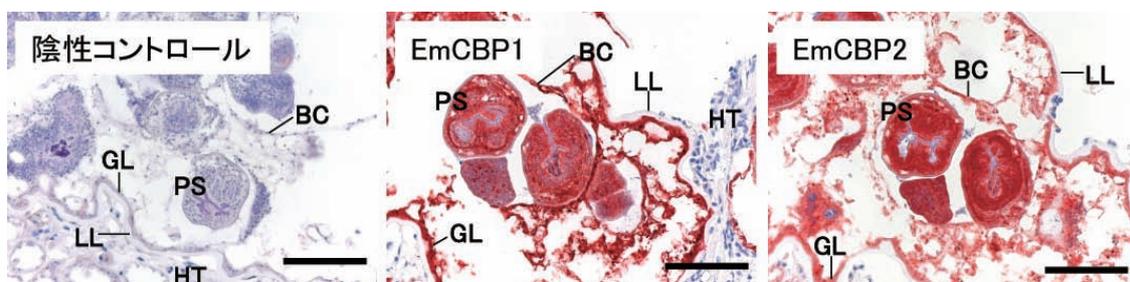


図5 EmCBP1 および EmCBP2 の局在  
PS, 原頭節; GL, 胚層; BC, 繁殖胞; LL, 角皮層; HT, 宿主組織  
Scale bar=100 $\mu$ m

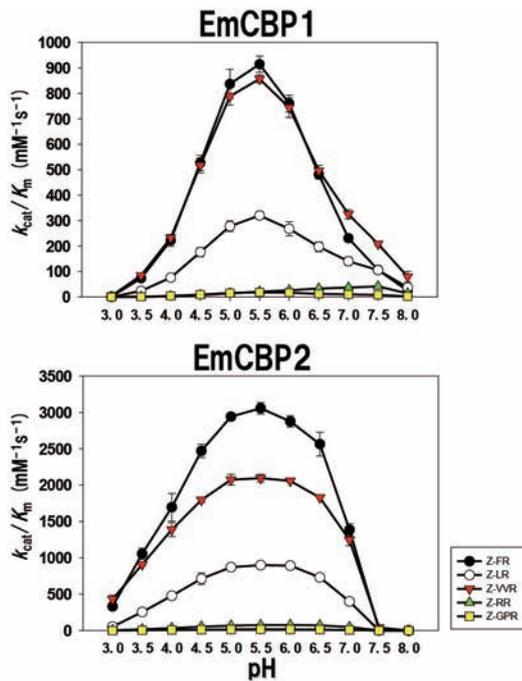


図6 EmCBP1 および EmCBP2 の基質特異性と pH プロファイル

*S. mansoni* では別のアイソフォーム (SmB1) も報告されているが、その 173 番目のアミノ酸は中性のセリンである。SmB1 と SmB2 の速度定数を解析すると、SmB1 の速度定数比は 12 であり、SmB2 の速度定数比は 80 である<sup>32)</sup>。つまり、これらの結果より、173 番目のアミノ酸残基が基質特異性に関与している可能性が示唆される。

EmCBP1 および EmCBP2 の至適 pH の解析を擬一時反応条件下で行ったところ、共に至適 pH は 5.5 であった。また、EmCLP1 および EmCLP2 と同様に、中性領域を含む広範な pH で水解活性を示していた。EmCBP1 および EmCBP2 は、エキノコックス幼虫外に分泌されていることより、ライソゾーム酵素としてだけでなく、細胞外酵素としての機能も持っていることが示唆された。しかしながら、EmCBP2 の分解活性が、生理的 pH に近似する pH 7.5 条件下で急激に低下する現象が観察された。そこで、EmCBP1 および EmCBP2 の中性 pH 領域 (pH 6.5, 7.0, 7.5) における酵素活性の安定性について解析した。その結果、EmCBP1 は pH 7.5 で酵素活性の不活化が観察され、その半減期は約 5 分であった。EmCBP2 は、調べた全ての pH で不活化が観察され、pH 6.5 での半減期は 30 分、pH 7.0 での半減期は 2 分、pH 7.5 での半減期

は 10 秒であった。この結果より、中性 pH に感受性を示す EmCBP1 および EmCBP2 が細胞外酵素として活性を有していない可能性が示唆された。エキノコックス寄生部位は常に炎症反応が生じているが、炎症反応は組織の酸性化を促すことが知られている<sup>33)</sup>。また、ある種のがん細胞から分泌されカテプシン B は、細胞外のヘパリンと相互作用することにより、弱アルカリ条件下で酵素活性が安定化することが知られている<sup>34, 35)</sup>。したがって、EmCBP1 および EmCBP2 は、試験管内の実験では中性 pH での酵素失活が観察されたが、*in vivo* では細胞外酵素としての役割を果たしているかもしれない。

#### 4) EmCBP1, EmCBP2 によるタンパク質分解活性

EmCBP1 ならびに EmCBP2 のタンパク質分解活性に関して、液性分子基質としてヒト免疫グロブリン G およびヒト血清アルブミン、また、細胞外マトリックス分子基質として I 型および IV 型コラーゲン、フィブロネクチンを用いて解析を行った。その結果、両酵素共に全ての基質を分解する活性を有していることが明らかとなった。

哺乳類カテプシン B もカテプシン L と同様に、I 型コラーゲンの非螺旋性であるトリペプチド部のみを切断できる<sup>29)</sup>。これに対し、EmCBP1 および EmCBP2 は I 型コラーゲンの 3 重螺旋領域を切断でき、この活性は EmCLP1 および EmCLP2 と同様であった。

#### 4. エキノコックス幼虫における役割

EmCLP1, EmCLP2, EmCBP1, EmCBP2 は、至適 pH が酸性であり、イムグロブリン、アルブミン、コラーゲン、フィブロネクチンなどを含むタンパク質に対する広範な分解活性があることより、リソソーム内酵素としての機能を有しており、エキノコックス幼虫の栄養摂取のためのタンパク質代謝に関与していることが考えられる。

また、寄生虫細胞外へ積極的に分泌されていることより、細胞外酵素としての役割も持ち、以下の現象に関与している可能性が示唆される。

##### ①栄養取り込み促進

エキノコックスが属する条虫は消化管が退化しているために無く、栄養をその体表面から吸収する必要がある。したがって、分泌された酵素が宿主タンパク質を分解し低分子化することにより、体表からの栄養吸

表3 エキノコックス幼虫カテプシン様ペプチダーゼの性状

	EmCLP1	EmCLP2	EmCBP1	EmCBP2
分子サイズ(kDa)	25.8 26.1	27.0 31.1	25.5 24.5	29.9 27.0
発現局在	胚層 繁殖胞 原頭節 分泌	胚層 繁殖胞 原頭節 分泌	胚層 繁殖胞 原頭節 分泌	胚層 繁殖胞 原頭節 分泌
pH 中性域での活性	+	+	+	±
液性分子分解 イムノグロブリン アルブミン	++	+++	++	+
細胞外マトリックス分解 I型コラーゲン IV型コラーゲン フィブロネクチン	++	+++	+	+
速度定数 $k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )				
Z-Phe-Arg-MCA	794±13	13081±406	1627±49	2638±23
Z-Arg-Arg-MCA	N.D.	N.D.	18±0.1	19±0.4

N.D.: not done

収を促進している可能性が示唆される。

### ②宿主組織浸潤

線虫や吸虫のいくつかの種では、宿主組織内にシステインペプチダーゼを分泌し、それらがコラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスを分解することにより、寄生虫の宿主組織内の移動に関与することが報告されている<sup>7, 36, 37)</sup>。エキノコックス幼虫は、その胚層細胞が外生出芽様式で宿主組織内に浸潤することにより包虫の発育や増殖が促される<sup>20)</sup>。エキノコックス幼虫カテプシンL様ならびにカテプシンB様システインペプチダーゼが、細胞外マトリックス分子の分解活性を有していることより、それらが宿主組織の結合織や基底膜を脆弱化し、エキノコックス幼虫胚層細胞の組織浸潤を促進する可能性が示唆される。

### ③免疫回避

エキノコックス幼虫は、宿主のイムノグロブリンを寄生虫Fcレセプターを介して非特異的に寄生虫の小胞表面に結合することが出来る<sup>38-40)</sup>。つまり、イムノグロブリンで寄生虫体をマスクすることにより、また、イムノグロブリンFc領域を介したエフェクター機能を減弱化することにより、宿主免疫から介していると考えられている。このイムノグロブリン結合活性とカテプシンL様ならびにカテプシンB様システインペプチダーゼのイムノグロブリン分解活性により、宿主による免疫攻撃を逃れている可能性が示唆さ

れる。

## 5. テニア科条虫のペプチダーゼ

テニア科条虫は、①発育に長時間要する、②宿主特異性が強く、代替宿主の導入が困難である、③試験管培養法が確立されていないなどの理由により、生物学的特性の研究は殆ど行われていない。したがって、ペプチダーゼに関する知見は限られている。

*Echinococcus multilocularis* では、筆者が報告したペプチダーゼ以外に、炎症誘発性のケモカインであるエオタキシンを分解し、カルシウムを補因子とするシステインペプチダーゼが報告されている<sup>41)</sup>。*Echinococcus granulosus* では、酵素活性に関する詳細な解析はなされていないが、アミノペプチダーゼ<sup>42)</sup> およびメタロペプチダーゼ<sup>43)</sup> の存在が報告されている。また、*Taenia solium* では、幼虫より分泌されたシステインペプチダーゼが、試験管内でヒトリンパ球集団の中からCD4陽性細胞を枯渇させる活性を持つこと<sup>44)</sup>、また、ヒトCD4陽性細胞のアポトーシスを誘導する活性を持つこと<sup>45)</sup> が報告されている。さらに、カテプシンL様ペプチダーゼの遺伝子クローニングと酵素性状に関する報告がなされ、イムノグロブリンやウシ血清アルブミンを分解できるが、コラーゲンを分解できないこと<sup>46)</sup> が明らかとなっている。*Taenia crassiceps* では、イムノグロブリンを分解するシステ

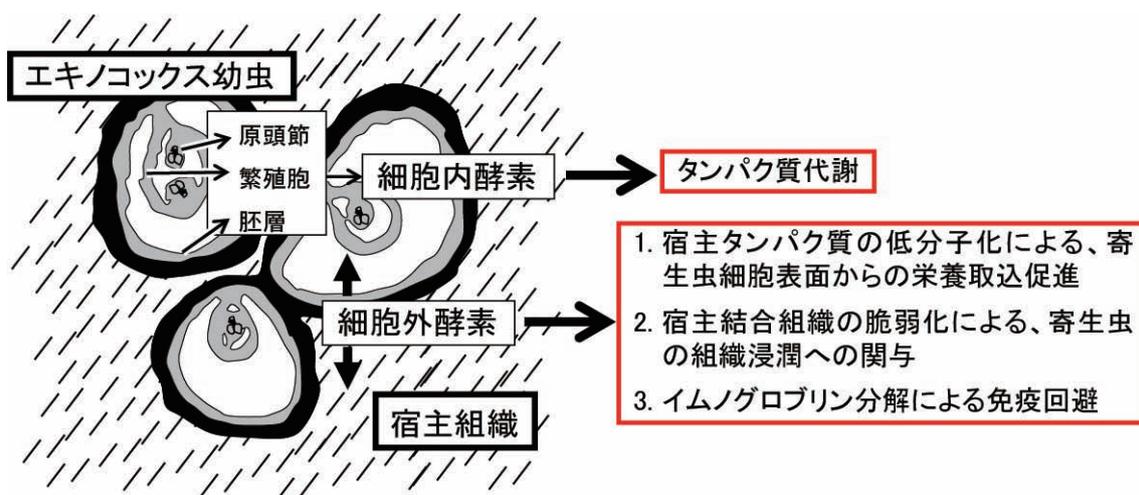


図7 エキノコックス幼虫におけるカテプシン様ペプチダーゼの役割 (推測)

インペプチダーゼが見出されている<sup>47)</sup>。

以上のように、テニア科条虫より分泌されるペプチダーゼは、宿主免疫応答を攪乱する活性を持っており、それが十年以上に渡るヒトへの寄生を可能にしている要因の一つかもしれない。

## 6. おわりに

エキノコック幼虫カテプシンL様ならびにカテプシンB様システインペプチダーゼの酵素活性性状は全て試験管内の実験で得られたものであり、宿主内で実際の様な機能を有しているのか全くの不明である。したがって、宿主内での機能を明らかにするために、寄生虫酵素特異的な阻害剤の開発や遺伝子ノックアウトシステムの確立が必要である。また、他のペプチダーゼに関しても解析する必要がある。

## 参考文献

- 1) Eckert J, Conraths FJ, Tackmann K. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? *Int J Parasitol* 2000;30:1283-1294.
- 2) McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet* 2003;362:1295-1304.
- 3) Pawlowski, Z.S., Eckert, J., Vuitton, D.A. et al. Echinococcosis in 2001; humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. In.
- 4) Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 2002;120:1-21.
- 5) McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol* 2006;1:497-536.
- 6) Robinson MW, Dalton JP, Donnelly S. Helminth pathogen cathepsin proteases: it's a family affair. *Trends Biochem Sci* 2008;33:601-608.
- 7) Berasain P, Goni F, McGonigle S, Dowd A, Dalton JP, Frangione B, Carmona C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J Parasitol* 1997;83:1-5.
- 8) Berasain P, Carmona C, Frangione B, Dalton JP, Goni F. *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp Parasitol* 2000;94:99-110.
- 9) Cordova M, Jara J, Del Nery E, Hirata IY, Araujo MS, Carmona AK et al. Characterization of two cysteine proteinases secreted by *Fasciola hepatica* and demonstration of their kininogenase activity. *Mol Biochem Parasitol* 2001;116:109-115.
- 10) Prowse RK, Chaplin P, Robinson HC, Spithill TW. *Fasciola hepatica* cathepsin L suppresses sheep lymphocyte proliferation in vitro and modulates surface CD4 expression on human and ovine T cells. *Parasite Immunol* 2002;24:57-66.
- 11) Chung YB, Yang HJ, Kang SY, Kong Y, Cho SY. Activities of different cysteine proteases of *Paragonimus westermani* in cleaving human IgG. *Korean J Parasitol*

- 1997;35:139-142.
- 12) Shin MH, Chung YB, Kita H. Degranulation of human eosinophils induced by *Paragonimus westermani*-secreted protease. *Korean J Parasitol* 2005;43:33-37.
- 13) Brady CP, Dowd AJ, Brindley PJ, Ryan T, Day SR, Dalton JP. Recombinant expression and localization of *Schistosoma mansoni* cathepsin L1 support its role in the degradation of host hemoglobin. *Infect Immun* 1999;67:368-374.
- 14) Caffrey CR, McKerrow JH, Salter JP, Sajid M. Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol* 2004;20:241-248.
- 15) Rhoads ML, Fetterer RH. Developmentally regulated secretion of cathepsin L-like cysteine proteases by *Haemonchus contortus*. *J Parasitol* 1995;81:505-512.
- 16) Dalton JP, Neill SO, Stack C, Collins P, Walshe A, Sekiya M et al. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *Int J Parasitol* 2003;33:1173-1181.
- 17) Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, Benet L, McKerrow JH. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5160-5161.
- 18) Abdulla MH, Lim KC, Sajid M, McKerrow JH, Caffrey CR. *Schistosomiasis mansoni*: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Med* 2007;4:e14.
- 19) Alcalá-Canto Y, Ibarra-Velarde F, Sumano-Lopez H, Gracia-Mora J, Alberti-Navarro A. Effect of a cysteine protease inhibitor on *Fasciola hepatica* (liver fluke) fecundity, egg viability, parasite burden, and size in experimentally infected sheep. *Parasitol Res* 2007;100:461-465.
- 20) Thompson RCA. Biology and systematics of *Echinococcus*; In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1750.
- 21) Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, Ito A. Cloning and characterization of cathepsin L-like peptidases of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Mol Biochem Parasitol* 2007;154:181-189.
- 22) Sako Y, Nakaya K, Ito A. *Echinococcus multilocularis*: identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode. *Exp Parasitol* 2011;127:693-701.
- 23) Sakanari JA, Staunton CE, Eakin AE, Craik CS, McKerrow JH. Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:4863-4867.
- 24) McGrath ME. The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1999;28:181-204.
- 25) Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477:98-111.
- 26) Loukas A, Selzer PM, Maizels RM. Characterisation of Tc-cpl-1, a cathepsin L-like cysteine protease from *Toxocara canis* infective larvae. *Mol Biochem Parasitol* 1998;92:275-289.
- 27) Sol-Church K, Frenck J, Bertenshaw G, Mason RW. Characterization of mouse cathepsin R, a new member of a family of placentally expressed cysteine proteases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492:488-492.
- 28) Sol-Church K, Picerno GN, Stabley DL, Frenck J, Xing S, Bertenshaw GP, Mason RW. Evolution of placentally expressed cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:23-29.
- 29) Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 1998;273:32347-32352.
- 30) Musil D, Zucic D, Turk D, Engh RA, Mayr I, Huber R et al. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J* 1991;10:2321-2330.
- 31) Hasnain S, Hiramata T, Tam A, Mort JS. Characterization of recombinant rat cathepsin B and nonglycosylated mutants expressed in yeast. New insights into the pH dependence of cathepsin B-catalyzed hydrolyses. *J Biol Chem* 1992;267:4713-4721.
- 32) Caffrey CR, Salter JP, Lucas KD, Khiem D, Hsieh I, Lim KC et al. SmCB2, a novel tegumental cathepsin B

- from adult *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol 2002;121:49-61.
- 33) Kellum JA, Song M, Li J. Science review: extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. Crit Care 2004;8:331-336.
- 34) Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E et al. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. J Biol Chem 2001;276:944-951.
- 35) Roshy S, Sloane BF, Moin K. Pericellular cathepsin B and malignant progression. Cancer Metastasis Rev 2003;22:271-286.
- 36) Rhoads ML, Fetterer RH. Extracellular matrix degradation by *Haemonchus contortus*. J Parasitol 1996;82:379-383.
- 37) Smooker PM, Jayaraj R, Pike RN, Spithill TW. Cathepsin B proteases of flukes: the key to facilitating parasite control? Trends Parasitol 2010;26:506-514.
- 38) Ali-Khan Z, Siboo R. *Echinococcus multilocularis*: distribution and persistence of specific host immunoglobulins on cysts membranes. Exp Parasitol 1981;51:159-168.
- 39) Alkarmi TO, Alshakarchi Z, Behbehani K. *Echinococcus multilocularis*: the non-specific binding of different species of immunoglobulins to alveolar hydatid cysts grown in vivo and in vitro. Parasite Immunol 1988;10:443-457.
- 40) Baz A, Carol H, Marco M, Casabo L, Jones F, Dunne D, Nieto A. Fc-binding molecules specific for human IgG1 and IgG3 are present in *Echinococcus granulosus* protoscoleces. Parasite Immunol 1998;20:399-404.
- 41) Mejri N, Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* metacystode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine. Parasitol Res 2009;105:1253-1260.
- 42) McManus DP, Barrett NJ. Isolation, fractionation and partial characterization of the tegumental surface from protoscoleces of the hydatid organism, *Echinococcus granulosus*. Parasitology 1985;90:111-129.
- 43) Marco M, Nieto A. Metalloproteinases in the larvae of *Echinococcus granulosus*. Int J Parasitol 1991;21:743-746.
- 44) Molinari JL, Mejia H, White AC Jr, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P. *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacystodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. Exp Parasitol 2000;94:133-142.
- 45) Tato P, Fernandez AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepulveda J, Molinari JL. A cysteine protease from *Taenia solium* metacystodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. Parasitol Res 2004;92:197-204.
- 46) Li AH, Moon SU, Park YK, Na BK, Hwang MG, Oh CM et al. Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Taenia solium* metacystode. Vet Parasitol 2006;141:251-259.
- 47) Baig S, Damian RT, Morales-Montor J, Olecki P, Talhouk J, Hashmey R, White AC Jr. Characterization of excretory/secretory endopeptidase and metallo-aminopeptidases from *Taenia crassiceps* metacystodes. J Parasitol 2005;91:983-987.

## Cathepsin-like cysteine peptidases of *Echinococcus multilocularis*

SAKO Yasuhito\* ITO Akira\*

---

### Summary

Alveolar echinococcosis, caused by the larval stage of *Echinococcus multilocularis*, is a serious parasitic disease of humans in Northern hemisphere countries in the higher latitudes. *E. multilocularis* metacestodes survive for many years in human host, however the survival mechanism is under unclear. Biochemical studies of protozoan, nematode and trematode parasites have revealed that peptidases, especially cysteine peptidases, are key molecules of pathogenicity of parasites and facilitate evasion from host immune responses, essential nutrient uptake, and tissue penetration. In contrast, a few studies of peptidase of cestode parasite *E. multilocularis* have been performed. Here, I introduce the characteristics of cathepsin L- and cathepsin B-like cysteine peptidases of *E. multilocularis*.

**Key words** *Echinococcus multilocularis* larvae, cathepsin L-like, cathepsin B-like, recombinant enzyme, enzymatic characteristics

---

\* Asahikawa Medical University