

ていると考えられる。

また、赤痢アメーバと *E. dispar* における 150-kDa レクチンのアミノ酸レベルでの相同性は 72-73%であったが、システイン残基はすべて保存されていた。このことは、システインによって形成される高次構造が、この蛋白質の機能に重要な意味を持っていることを示唆している。赤痢アメーバと *E. dispar* におけるこのレクチンの抗原性の差や塩基配列の差は、両種の鑑別診断にも応用できると考えられる。

E. 結論

赤痢アメーバの 150-kDa レクチンにおける接着阻止抗体のエピトープは、603 番目から 753 番目アミノ酸の間と 989 番目から 1088 番目アミノ酸の間に存在すると考えられた。赤痢アメーバと形態的に区別できない *E. dispar* においても 150-kDa レクチンの遺伝子をクローニングし、解析した。これらの成果は赤痢アメーバ症の診断法と予防法の開発につながるものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsutsumi, Y., Tachibana, H., Azuma, S. and Ariwa, R. Acanthamebic meningoencephalitis associated with alcoholic liver cirrhosis. *Pathol. Case Rev.*, 7 (6):273-277, 2002

2. 学会発表

橘 裕司、程 訓佳、金田良雅. 赤痢アメーバ 150-kDa レクチン (Igl) の組換え蛋白質調製と性状解析. 第 43 回日本熱帯医学会大会. 2002 年 11 月

橘 裕司、程 訓佳、金田良雅. *Entamoeba dispar* 150-kDa レクチンの遺伝子クローニングと解析. 第 72 回日本寄生虫学会大会. 2003 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アメーバの嚢子形成、脱嚢機構、及び関連の研究を通じたアメーバ感染
予防法確立に関する研究

分担研究者 牧岡 朝夫 東京慈恵会医科大学助教授

研究要旨 蛋白質の翻訳後の脂質修飾であるファルネシル化はファルネシル転移酵素 (FT) により触媒され、細胞内情報伝達分子として重要な低分子量 G 蛋白質 Ras の膜への付加に必須であるばかりでなく、他の蛋白質との相互作用においても重要な働きをしている。Ras に突然変異が生じると細胞が癌化することが知られており、この Ras の機能発現にファルネシル化が必須であることから、FT は抗癌剤の標的分子としても注目されている。今回、アメーバ症に対する新規薬剤開発の標的としての重要性を明らかにするため、赤痢アメーバの FT 遺伝子のクローニング、組換え蛋白質の酵素学的解析を行った。赤痢アメーバ FT の FT α 、FT β サブユニットはそれぞれ 298、375 アミノ酸からなり、ヒトの FT α ・FT β と 29、36% の相同性を示した。この組換え FT はヒトの Ras (-CVLS) に対して活性を示したが、変異型の Ras (-CVLL) に対しては活性を示さなかった。調製した赤痢アメーバの C 末端の異なる 4 種の組換え Ras 蛋白質 (-CIMF、-CELL、-CSVM、-CVVA) の赤痢アメーバ組換え FT に対する基質活性を調べた結果、Ras (-CVVA) のみが基質活性を示した。また、高等動物 FT 阻害剤の赤痢アメーバ組換え FT に対する効果を調べた結果、赤痢アメーバ組換え FT はすべての阻害剤に対して抵抗性を示した。以上の結果から、赤痢アメーバ FT と高等動物 FT との相違が明らかになり、標的分子としての重要性が示唆された。

A. 研究目的

蛋白質の翻訳後の脂質修飾であるプレニル化は細胞内情報伝達分子として重要な低分子量 G 蛋白質の膜への付加に必須であるばかりでなく、他の蛋白質との相互作用においても重要な働きをしている。プレニル化にはファルネシル転移酵素 (FT) に触媒されるファルネシル化とゲラニルゲラニル転移酵素 (GGT) によるゲラニルゲラニル化がある。低分子量 G 蛋白質の一つである Ras は FT によりファルネシル化されるが、Ras に突然変異が生じると細胞が癌化することが知られている。この Ras の機能発現にファルネシル化が必須であることから、FT は抗癌剤の標的分子としても注目

され、特異的な阻害剤の開発が行われている。今回、アメーバ症に対する新規薬剤の開発を目的として赤痢アメーバの FT に注目し、その遺伝子のクローニング、組換え蛋白質の酵素学的解析を行った。

B. 研究方法

FT は α と β サブユニットからなるヘテロダイマーであることから、まず赤痢アメーバの FT α と FT β の N 末端と C 末端の塩基配列をゲノム・データベースから得て FT α と FT β それぞれの cDNA 全長を PCR で増幅・クローニングし、塩基・アミノ酸配列を決定した。次に、FT α と FT β の ORF をプラスミド (pQE31) 上にリボゾーム結合部位

をはさんでつなげ、発現プラスミドを作成した。この発現プラスミドを大腸菌に導入し、IPTGにより発現を誘導した。発現した FT 複合体は FT α の N 末端側に付加したヒスチジン・タグを用いて単離し、さらに Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより精製した。酵素活性はヒト組換え Ras への [3H] フェルネシル・ピロリン酸の取り込みによって測定した。高等動物 FT 阻害剤として 4 種のフェルネシル・ピロリン酸アナログと 1 種のペプチドミメティックスを用いた。FT の基質である Ras を赤痢アメーバから得るため、FT の場合と同様にゲノム・データベースの検索を行い、C 末端塩基配列の異なる 4 種の Ras 遺伝子を得た。これらの遺伝子を導入した発現プラスミドを構築し、組換え Ras 蛋白質を調製した。

C. 研究結果

赤痢アメーバの FT α 、FT β サブユニットはそれぞれ 298、375 アミノ酸からなり、ヒト、*Arabidopsis thaliana*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Trypanosoma brucei* の FT α ・FT β と 24–36% の相同性を示した。FT α および FT β 組換え蛋白質は 38kD・43kD 蛋白質複合体として高い純度で精製された。この組換え FT はヒトの Ras (-CVLS) に対して活性を示したが、変異型の Ras (-CVLL) に対しては活性が認められなかった。また、FT の活性発現には Mg^{2+} および Zn^{2+} が必要であると報告されているが、赤痢アメーバ FT も EDTA でこれらの 2 価イオンをキレートすることにより、活性が認められなくなった。次に、FT の基質である赤痢アメーバ Ras の組換え FT に対する基質活性を調べるため、C 末端の異なる 4 種の組換え Ras 蛋白質 (-CIMF、-CELL、

-CSVM、-CVVA) を調製した。このうち Ras 1 (-CIMF)、Ras 2 (-CELL) についてはすでに報告されているものと一致し、Ras 3 (-CSVM) および Ras 4 (-CVVA) は今回新たに得られたものである。このうち Ras 4 は他の 3 種に比し、サイズが小さかった。赤痢アメーバ組換え FT がこれらの組換え Ras に対して活性を示すかどうか調べた結果、Ras 4 (-CVVA) のみが基質活性を示した。また、高等動物 FT 阻害剤の赤痢アメーバ組換え FT に対する効果を調べた結果、4 種のフェルネシル・ピロリン酸アナログおよび 1 種のペプチドミメティックスの IC_{50} 値はヒト FT の場合と比較して著しく高い値であった。

D. 考察

赤痢アメーバ FT の FT α 、FT β サブユニットはそれぞれ 298、375 アミノ酸からなりこれまで報告されているヒトを含む他の生物の FT と比較して最も小さいサイズであった。ヒトを含む高等動物 FT 間の相同性に比し、赤痢アメーバとヒト FT の相同性は低い値であった。2 つのサブユニットからなるヒト FT を大腸菌で発現させるために、両サブユニットの ORF をリボソーム結合部位をはさんでつなげた発現プラスミドを構築する方法が用いられたが、この方法は今回の赤痢アメーバ FT の場合にも有用であった。また、N 末端に付加したヒスチジン・タグにより、組換え蛋白質の精製も容易に行え、非常に高い純度の組換え FT が得られた。組換え蛋白質の性状を調べるうえでその純度は重要であり、今回得られた組換え FT は十分にその目的にかなうものと考えられた。FT によりフェルネシル化を受ける蛋白質はその C 末端に CAAX (C はシステイン、A は aliphatic なア

ミノ酸、X は末端のアミノ酸) と呼ばれるモチーフを共有し、このモチーフを FT が認識する。末端 X のアミノ酸の多くはメチオニン (M)、システイン (C)、セリン (S)、グルタミン (Q)、アラニン (A) のいずれかと報告されている。今回のデータ・ベースの検索で赤痢アメーバ Ras に関しては末端配列の異なる 4 種しか得られなかった。Ras 3 (-CSVM) はその末端がメチオニン (M) であったが、基質活性を示さず、赤痢アメーバ FT は特有の基質特異性を示すことが示唆された。高等動物 FT 阻害剤を用いた実験結果から従来報告されている FT 阻害剤は赤痢アメーバ FT に対してはほとんど無効であることが明らかになった。このように赤痢アメーバ FT と高等動物 FT との違いが明らかになり、新たな薬剤開発の重要な標的分子になると考えられた。

E. 結論

赤痢アメーバの組換え FT はヒトの FT と 29-36% の相同性しか示さず、その基質特異性に関してもヒトの FT との違いが認められた。また、赤痢アメーバ FT は高等動物 FT 阻害剤に対して著しく抵抗性があることが明らかになった。以上の結果から赤痢アメーバ FT は新たな薬剤開発の重要な標的になることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Makioka A, Kumagai M, Ohtomo H, Kobayashi S, Takeuchi T (2002) Effect of proteasome inhibitors on the growth,

encystation, and excystation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 88, 454-459.

2) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2002) Possible role of calcium ions, calcium channels and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 88, 837-843.

3) Mizuno Y, Makioka A, Kawazu S, Kano S, Kawai S, Akaki M, Aikawa M, Ohtomo H (2002) Effect of jasplakinolide on the growth, invasion, and actin cytoskeleton of *Plasmodium falciparum*. Parasitol. Res. 88, 844-848.

4) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2002) Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. J. Parasitol. 88, 994-999.

5) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2003) *Entamoeba invadens*: Inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin. Exp. Parasitol. in press

2. 学会発表

1) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. Conference on Amebiasis and the Biology of *Entamoeba histolytica*. Agra. 2002年2月.

2) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T. Molecular characterization of farnesyltransferase of *Entamoeba*

histolytica. Conference on Amebiasis and the Biology of *Entamoeba histolytica*. Agra. 2002年2月.

3) 牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤. *Entamoeba* の増殖、嚢子形成および脱嚢に及ぼすプロテアソーム阻害剤の効果。第71回日本寄生虫学会大会。伊勢原。2002年3月。

4) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義. 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素遺伝子のクローニングと発現。第71回日本寄生虫学会大会。伊勢原。2002年3月。

5) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Possible role of calcium ion, calcium channel, and calmodulin in excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. 10th International Congress of Parasitology. Vancouver. 2002年8月。

6) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by aphidicolin. 第37回日米医学協力寄生虫疾患専門部会日米合同会議。長崎。2002年8月。

7) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by aphidicolin. 第13回日独原虫病シンポジウム。長崎。2002年10月。

8) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T. Molecular cloning and characterization of farnesyl transferase of *Entamoeba histolytica*. 第13回日独原虫病シンポジウム。長崎。2002年10月。

9) 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内 勤、野崎智義. 赤痢アメーバのファルネシル転移酵

素の解析。第75回日本生化学会大会。京都。2002年10月。

10) 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直熙、小林正規、竹内 勤. *Entamoeba* の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育に対するオリザリンの効果。第62回日本寄生虫学会東日本大会。新潟。2002年10月。

11) 牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤. *Entamoeba* の増殖および分化へのプロテアソームの関与。第43回日本熱帯医学会大会。高知。2002年11月。

12) 牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義. 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析。第43回日本熱帯医学会大会。高知。2002年11月。

13) 牧岡朝夫、熊谷正広、大友弘士、小林正規、竹内 勤. *Entamoeba* の増殖と分化に及ぼすプロテアソーム阻害剤の効果。第35回日本原生動物学会大会。高知。2002年11月。

14) 牧岡朝夫、熊谷正広、竹内 勤、野崎智義. 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析。第35回日本原生動物学会大会。高知。2002年11月。

15) 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直熙、小林正規、竹内 勤. *Entamoeba* の脱嚢および脱嚢後アメーバの発育に対するカルシウムイオンおよびカルモデユリン阻害剤の効果。第72回日本寄生虫学会大会。久留米。2003年3月。

16) 熊谷正広、牧岡朝夫、渡辺直熙、竹内勤、野崎智義. 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析(2)。第72回日本寄生虫学会大会。久留米。2003年3月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |

⑭

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

赤痢アメーバの多型性解析及びそれに基づくハイリスク群における
感染源の特定化等に関する検討

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所寄生動物部 室長

研究要旨 我が国に浸淫するアメーバ症の国内への流入経路を明らかにするべく、タイ・バングラデッシュなどの海外の分離株と国内の分離株を用いて多型性遺伝子のタイピングを行った。多型性の知られる4つのDNA領域(Locus 1-2, 5-6, SREFP, キチナーゼ)を標的としてPCR及びシーケンスにより高解像度タイピングを達成した。わが国のアメーバ症は性行為感染症としての性格が強いため、我々は、HIVなどで見られるように欧米並びに東南アジア諸国から赤痢アメーバ株が流入したのではないかと仮定した。しかしながら、解析の結果、昨年度解析した国内感染例の分離株と今回解析した海外からの分離株との間で上記の4つの多型遺伝子の遺伝子型は大きく異なっていた。従って、我々の仮説は棄却され、国内の赤痢アメーバ株は他の地域から比較的離れた過去に流入したと考えられた。更に我々は、核酸シーケンスを確定せず、簡便にSREHP遺伝子の多型を鑑別するRFLPによる方法を実用化した。以上の結果より、多型遺伝子を用いた高解像度タイピング法が我が国に浸淫する分離株の流入経路を特定化するのにきわめて有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

アメーバ症の流行はわが国で主に男性同性愛者と知的障害者施設において深刻な問題となっている。これらの感染の現状に関する疫学的な解析は主任研究者の研究報告書を参照されたい。現在のアメーバ症の流行、特に施設における濃厚な感染を引き起こす大きな理由の一つは、多くの感染者が特に顕著な症状を起こさず、不顕性シストキャリア化することである。赤痢アメーバの感染者のうち、およそ数%のみが発症することは臨床家、研究者の間でよく知られているが、その理由については原虫の病原性の多様性、宿主の免疫感受性の多様性により仮に説明されているに過ぎない。赤痢アメーバ側の遺伝的な多様性については、我々

のこれまでの研究により、十分に方法論が確立している。昨年度はポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)を用いたDNA多型解析によりわが国で分離された赤痢アメーバ株の遺伝的多型を解明した。標的遺伝子として用いたのは細胞表面タンパク質をコードするSREHP(*serine-rich E. histolytica* protein)、キチナーゼ並びに非翻訳領域のLocus 1-2, 5-6であった。分離株は海外渡航歴のない男性同性愛者並びに知的障害者のアメーバ症患者から分離し、それぞれの遺伝子がいずれも高い遺伝的多型を示すことを報告した。本年度は更に、わが国への赤痢アメーバ株の流入経路を解明することを目的として研究を行い、いくつかの非常に重要な知見を得た。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ株の獲得

解析に用いた赤痢アメーバ株の一覧を表 1 に示す。27 株はタイのマヒドン大学で分離・培養された細菌共生株・無菌培養株或いは肝膿瘍穿刺液、5 株はバングラデッシュからの細菌共生株、それぞれ 1 株はガーナ、カンボジア、インドネシアで感染した日本人海外渡航者から得られた。患者のバックグラウンド（分離の日時、臨床症状、血清反応、ザイモデーム）は図 1 に詳述した。

2. 赤痢アメーバ株からの DNA の抽出

細胞は 1000 g、5 分の遠心で沈渣とした。糞便並びに膿瘍液はそのまま用いた。抽出にはキアゲンの QIAamp Mini Stool DNA kit を用いた。

3. 赤痢アメーバ株のタイピング法
我々が遺伝的多型の解析に用いたのは Clark らがすでに報告している非翻訳領域の Locus 1-2, 5-6 並びに、Samuelson らが報告しているタンパク質をコードする SREHP (serine-rich *E. histolytica* protein)、キチナーゼ (chitinase) である。用いたプライマーは J. Clin. Microbiol.

40(11):4081-4090, 2002 に示した。反応液は 50 μ l で、0.1 μ g DNA, 1 mM プライマー, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 100 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 unit HotStarTaq DNA polymerase を含む。用いた cycling parameter は以下の通り。1) Taq activation at 95°C for 15 min, 2) denaturation at 94°C for 30 s; annealing at 50°C (SREHP and locus 5-6) or 45°C (chitinase and locus 1-2) for 30 s; extension at 72°C for 1 min; 30 cycles; and 3) extension at 72°C for 10 min。生成された PCR 産物は 2% NuSieve 3:1 agarose (BioWhittaker Molecular

Applications) 上で電気泳動した。

4. 核酸配列の決定

ゲル上で単一のバンドを示す PCR 産物は Pre-Sequencing kit (USB Corporation) で処理した後、直接シーケンスを行った。ゲル上で複数のバンドを示す PCR 産物は上記のとおりアガロース電気泳動で分離した後、GeneClean kit II (BIO101) を用いて精製した後、シーケンスに供した。シーケンス反応は ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems) を用いて行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer で解析した。得られたシーケンスは DNASYS software (Hitachi) を用いて解析し、それぞれの核酸配列データは GenBank/EMBL/DDBJ database に accession numbers AB096653-AB096676 として登録した。

（倫理面への配慮）アメーバ症患者からの試料の採取並びに解析はすべて、患者本人から或いは保護責任者から informed consent を取得した上で行った。

C. 研究結果

1. PCR とアガロースゲル電気泳動による海外赤痢アメーバ分離株の遺伝的多型

海外の赤痢アメーバ分離株の遺伝的多型をマクロで示すために、図 1A で、代表的な多型遺伝子である SREHP の PCR 断片のアガロース電気泳動のパターンを示した（図 1）。同図上に比較の為に、更に、国内の分離株の SREHP のパターンを示した。国内外のいずれの株でも 1-3 本のバンドが認められた。バンドのサイズ及びパターンは複雑に株間で異なっていた。一本または二本のバンドを与え、これらの遺伝子座が株によってはヘテ

口接合体であることを示唆していた。一方、1株でのみ(KU12)、3本のバンドが検出された。シーケンス(下を参照のこと)の結果、これら3本はいずれもSREHP遺伝子であることが確認された。従って、KU12株は少なくともトリプロイド(3倍体)であると予想された。

2. SREHPヌクレオチド並びにアミノ酸配列の多型性

1で得られたPCR産物をシーケンスした結果得られたSREHPのタイプを表1に示した。同時にchitinase, locus1-2, 5-6のデータもあわせて示した。更に、これまで得られたSREHP遺伝子のすべての遺伝子型をschematicに図2に示した。この図で示すとおりSREHPの多型性は非常に高度であった。更に、SREHPの翻訳されたアミノ酸レベルでの多型を図3に示した。図2、図3を比較するとアミノ酸レベルの多型性の程度は核酸レベルの多型性と比較すると若干程度が低いものの、依然として高いレベルの多型性を有することが明らかとなった。タイ由来の27株の中で、5種のlocus1-2、7種のlocus5-6、6種類のchitinase、そして13種類のSREHPタイプが見られた。このことからSREHPの遺伝子並びにアミノ酸多型のレベルが他の遺伝子座よりも高いことが明らかとなった。

3. 国内株と海外株の遺伝子タイプの比較

図4にLocus1-2, 5-6並びにchitinase, SREHPの各タイプの出現頻度を日本、タイ、その他の国の分離株で比較した結果を示した。図4Cに示すとおり、chitinaseの遺伝子型はどの地域からの分離株もC型が有意であり、3地域間で有意な差は見られなかった。Locus1-2に関してはB, Dについてはやや出現頻度の差が見られたが、統計的に有意な差とは言えず、地域間差ははっきりしな

かった。一方、Locus5-6, SREHPについては、地域間で大きな差が見られた。Locus5-6では例えば、A5v, A5v/Cv, A8などが日本株でのみ見られたのに対し、タイ株ではA7/Cv型が有意に高頻度に見られた。地域間の遺伝子型の分布パターンの違いはSREHPで最も顕著に見られた。例えば日本株とタイ株を比較した場合、SREHPの遺伝子型のうち両者で同一のSREHP型を示したのはわずか1つだけ(5%以下)だった。SREHP遺伝子型が共通していたこの日本株、タイ株で、SREHP以外の遺伝子型は異なっていた。従って全4遺伝子座を総合すると日本、タイ、それ以外の地域間で共通の遺伝子型は発見されなかった。

4. SREHP遺伝子多型のRFLP解析

明らかになったSREHP遺伝子座の多型を、核酸シーケンスを確定することなしに、簡便に解析するために、PCRにより増幅されたSREHP断片をAluIで消化した後、アガロースゲル電気泳動法により展開し、銀染色により可視化した(図1, B)。代表的なSREHP遺伝子型の断片の消化物の泳動パターンは核酸配列から予想されたパターン(図1, C)と一致した。しかしながら、SREHP断片のAluI消化により分離できる遺伝子型の種類は核酸配列決定により分離できる遺伝子型の7割程度であった。

D. 考察

わが国に存在するHIVの遺伝子型を解析した研究によれば(例えばWeniger et al., AIDS 8 (Suppl 2): S13-S28)、わが国に浸淫するHIV株のほとんどは欧米型とタイ型であることが明らかになっている。我々はわが国の赤痢アメーバ感染がHIVと高い混合感染を起こしていること、また、アメーバ症と他の性行為感染症との混合感染が多いこと、更に、

わが国とタイを中心とする東南アジア諸国との人的・経済的つながりの深さから、わが国の赤痢アメーバ分離株がタイなどの東南アジア諸国から流入したとの仮説で本年度の研究を開始した。しかしながら、我々の予想と異なり、わが国の分離株の遺伝子型はタイ、バングラデッシュなどの分離株の遺伝子型と全く異なっていた。また、他の研究グループがアフリカ、南米などの株を用いて RFLP を解析した結果と照らし合わせても、わが国の分離株の遺伝子型は特異である。従ってわが国に浸淫する赤痢アメーバ株は恐らく近年の東南アジア諸国などからの流入ではなく、我々及び他の研究グループが未だ解析していない地域からの流入と考えられる。もともと日本に古来から存在していた可能性もある。或いは、第二次世界大戦前に中国大陸或いは朝鮮半島から輸入されたのかもしれない。2年度以降の研究によりこれらの可能性が検証されるかもしれない。

本年度の研究により多型遺伝子を用いたタイピング法は赤痢アメーバの「指紋(finger print)」を客観的に同定・比較する優れた方法であることが一層明らかとなった。このような「指紋」の解析は、我が国に浸淫する赤痢アメーバ株の由来を今後明らかにするものと思われる。また、次年度以降、国内の施設を中心に起こる散発的な流行の原因となる感染者と原因赤痢アメーバ株の移動を詳細に明らかにするのに役立つと考えられる。

E. 結論

本年度の研究により、多型遺伝子を用いた赤痢アメーバ分離株の解析による応用が広がった。そのひとつの応用として、日本国内の分離株のわが国への流入経路を明らかにする

為に、今後強力なツールことを示すことができた。国内への流入経路の特定は、国内における感染源の特定とともに、今後の更なる疫学解析と、国内における感染の予防法の策定にとって極めて重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- i. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. J. Clin. Microbiol. 40, 4081-90.
- ii. Saito, T., Maeda, T., Nakazawa, M., Takeuchi, T., Nozaki, T., and Asai, T. (2002) Characterization of hexokinase in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. Int. J. Parasitol. 32, 961-967.
- iii. Basombrío, M., Gómez, L., Padilla, A.M., Ciaccio, M., Nozaki, T., and Cross, G.A.M. (2002) Targeted deletion of the Gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors. J. Parasitol. 88, 489-493.
- iv. Kabututu, Z., Martin, S.K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T., Munday, C.J., Duzenko, M., Lazarus, M., Urade, Y., and Kubata, B.K. (2002) Prostaglandin production from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H₂ in *Leishmania*. Int. J. Parasitol. 32, 1693-1700.
- v. Kubata, B.K., Munday, C.J., Nozaki, T., Kabututu, Z., Fukuzumi, S., Ohkubo, K., Lazarus, M., Martin, S.K.,

Duszenko, M., and Urade, Y. (2002) A key role for *Trypanosoma cruzi* Old Yellow Enzyme in the metabolism of trypanocidal drugs. *J. Exp. Med.* 196, 1241-1251.

和文

- i. 野崎智義、竹内勤 (2002) 寄生性原虫における硫黄含有アミノ酸生合成・分解経路-新しい抗原虫感染システム合成酵素方薬剤の開発標的-蛋白質核酸酵素 共立出版 47(1):21-29.
 - ii. 野崎智義 (2002) 医師が念頭におくべき輸入感染症の世界分布 今日の治療指針 医学書院 pp1010-1012.
 - iii. 野崎智義 (2002) アメーバ症 小児科診療 診断と治療社 第 65 巻, 12 号, 2132-2135.
2. 学会発表
- i. Haghghi, A., Zaki, M., Clark, G., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) Highly-polymorphic DNA of the *Entamoeba histolytica* isolates from Japan. 第 71 回日本寄生虫学会大会 March 29-30, 2002
 - ii. Nozaki, T. (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Amitochondriate Protozoan Genome Sequencing Projects: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, and *Giardia lamblia*. Cambridge, U.K., hosted by The Wellcome Trust, May 20-21, 2002
 - iii. 中野由美子、保田友義、繁田泰男、竹内勤、野崎智義 (2002) ファゴサイトーシス初期に形成される EhRab5 と EhRab7 が局在する空胞は病原性因子の輸送に関与する 第 55 回日本細胞生物学会大会 May 22, 2002

- iv. 野崎智義 (2002) 赤痢アメーバ貪食における Rab エフェクター分子の解析 第 10 回分子寄生虫学ワークショップ July 29-Aug 1, 2002.
- v. 岡田麻美 (2002) プロテオーム解析による赤痢アメーバ貪食機構の解析 第 10 回分子寄生虫学ワークショップ July 29-Aug 1, 2002.
- vi. Nozaki, T., Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nudeshima, M., Shigeta, Y., Hughes, M.A., Huston, C.D., Mann, B.M., and Petri, Jr., W.A. (2002) Isolation and partial characterization of Rab-interacting proteins from *Entamoeba histolytica*: toward the molecular understanding of Rab functions during phagocytosis. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002.
- vii. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., Masuda, G., and Nozaki, T. (2002) DNA fingerprinting of *Entamoeba histolytica* isolates. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Nagasaki, Aug 20-23, 2002.
- viii. Okada, M., Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., and Nozaki, T. (2002) Proteome analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* isolates. Thirty-seventh Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative

- Medical Science Program,
Nagasaki, Aug 20-23, 2002.
- ix. Nozaki, T. and Ali, V. (2002) Molecular analysis of iron-sulfur cluster formation in parasitic protozoa. The 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Aug 24-27, 2002.
- x. Kubata, B., Kabututu, Z., Nozaki, T., Lazarus, M., and Urade, Y. (2002) A key role for *Trypanosoma cruzi* old yellow enzyme in the metabolism of trypanocidal drugs. The 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Aug 24-27, 2002.
- xi. 岡田麻美、中野由美子、保田友義、野崎智義 (2002) プロテオーム解析による赤痢アメーバの貪食機構の解析 第75回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002.
- xii. 所正治、浅井隆志、小林正規、田辺将信、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバメチオニンガンマリアーゼの解析：腸管内寄生原虫における含硫アミノ酸代謝 第75回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002.
- xiii. 熊谷正広、牧岡朝夫、竹内勤、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析 第75回日本生化学会大会、京都、Oct 14-17, 2002.
- xiv. Nozaki, T. (2002) Proteomic analysis of phagocytosis in *Entamoeba histolytica*. Forum Cheju -8, The 5th Korea-Japan Parasitologists' Seminar, Oct 5-6, 2002
- xv. 野崎智義 (2002) 赤痢アメーバにおける鉄-硫黄クラスター合成の特殊性 第1回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 松山、Oct 12-13, 2002
- xvi. 中野由美子、保田友義、繁田泰男、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファゴサイトーシスにおける Rab 機能の特殊性 第25回日本分子生物学会年会 シンポジウム 横浜、Dec 11-14, 2002
- xvii. 中野由美子、保田友義、岡田麻美、ぬで島麻衣、野崎智義 (2003) 赤痢アメーバに特異的なファゴサイトーシスを調節する Rab GTPase の解析 感染症若手研究者沖縄フォーラム 宜野湾、沖縄 平成15年1月22-23
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
該当せず。
 2. 実用新案登録
該当せず。

表1

Table 1. Background and genotypes of the *Entamoeba histolytica* isolates

No.	Isolate	Isolation		Clinical diagnosis	Serology ^a	Zymodeme	DNA origin	Locus 1-2	Locus 5-6	Chitinase	SREHP
		Location	Date					Type	Type	Type	Type
1	TM-19	Thailand	1987	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	D	A6/Cv	C	12
2	TM-20	Thailand	1987	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	D	A6/Cv	C	12
3	TM-21	Thailand	1987	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	B	A6/Cv	C	6
4	TM-23	Thailand	1987	Colitis	+	II	Xenic	D	A11v	A	5
5	TM-24	Thailand	1987	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	I	A7	C	8/16
6	TM-25	Thailand	1987	Colitis	+	II	Xenic	D	A11v/A9	A/C	7
7	TM-27	Thailand	1987	Colitis	+	II	Xenic	K	A5	C	14
8	TM-28	Thailand	1987	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	D	A7/Cv	C	9
9	TM-29	Thailand	1987	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	D	A7/Cv	C	ND
10	TM-35	Thailand	NA	ALA ^c	+	ND	Pus	B	A7	E	Irre ^f
11	TM-36	Thailand	NA	ALA	+	ND	Pus	B	A6/Cv	C	Irre
12	TM-37	Thailand	NA	ALA	+	ND	Pus	L	A7	B	Irre
13	TM-51	Thailand	1992	ALA	+	II	Axenic	B	A6/Cv	C	3/F
14	TM-53	Thailand	1988	Colitis	+	II	Xenic	D	A7/Cv	C	10/L
15	TM-54	Thailand	1988	Colitis	+	II	Xenic	D	A7/Cv	C	10/L
16	TM-55	Thailand	1988	Colitis	+	II	Xenic	D	A7/Cv	C	10/L
17	TM-58	Thailand	1989	Colitis	+	II	Xenic	D	A7/Cv	C	10/L
18	TM-59	Thailand	1989	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	D	A7	C	G
18	TM-60	Thailand	1989	Colitis	+	II	Xenic	B	A7	E	G
20	TM-61	Thailand	1989	Colitis	+	II	Xenic	B	A7	C	G
21	TM-62	Thailand	1989	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	B	A7	E	G
22	TM-63	Thailand	1989	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	L	A6/Cv	C	G
23	TM-64	Thailand	1989	Colitis	+	II	Xenic	L	A6/C7	C	10/L
24	TM-65	Thailand	1989	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	D	A9v/A7	E	10/L
25	TM-67	Thailand	1989	Colitis	+	II	Xenic	D	A7/Cv	C/F	10/L
26	TM-83	Thailand	2001	Dysentery/Colitis	+	II	Xenic	D	A7/Cv	C	11
27	TM-84	Thailand	2001	Colitis	+	II	Pus	D	A7	C/F	L
28	TM-40	Bangladesh	2000	NA ^d	+	ND	Xenic	D	A6	E	15
29	TM-41	Bangladesh	2000	NA	+	ND	Xenic	D	A5	C	Mix ^g
30	TM-42	Bangladesh	2001	NA	+	ND	Xenic	D	A6	E	15
31	TM-43	Bangladesh	2001	NA	-	ND	Xenic	D	A9	C	13
32	TM-44	Bangladesh	2001	NA	+	ND	Xenic	D	A8/A5	C	1/4
33	KU6	Ghana	1994	Asymptomatic	+	II	Xenic	L	Cv	C	F
34	KU12	Cambodia	1995	Asymptomatic	+	II	Xenic	D	A5	C	2/17/18
35	PK1	Indonesia	2002	Colitis	ND ^e	ND	Stool	M	A9v/A7	G	H

^aゲル内沈降反応或いはELISA法が血清反応に用いられた

^cALA, アメーバ性肝臓癌

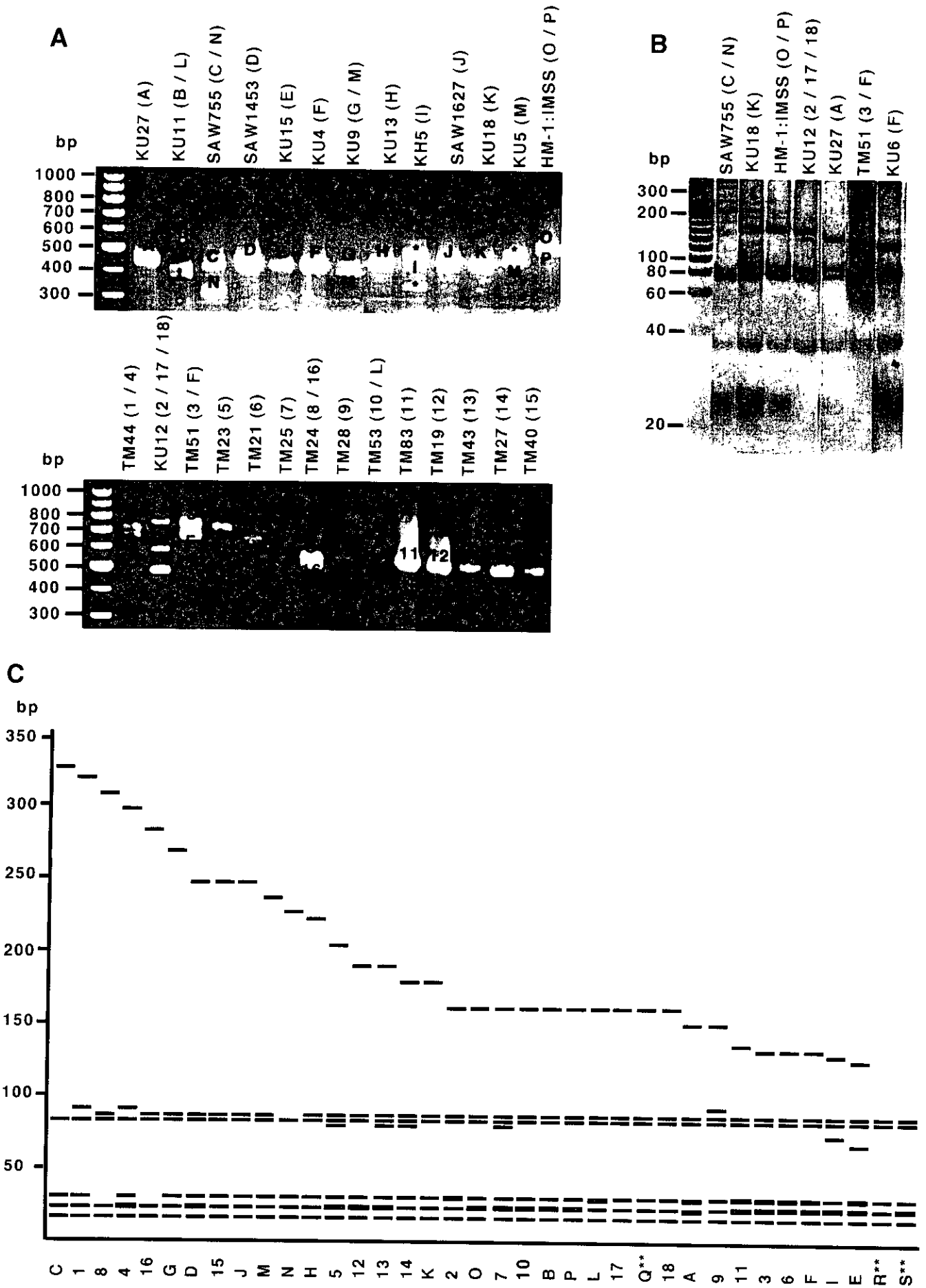
^dNA, データなし

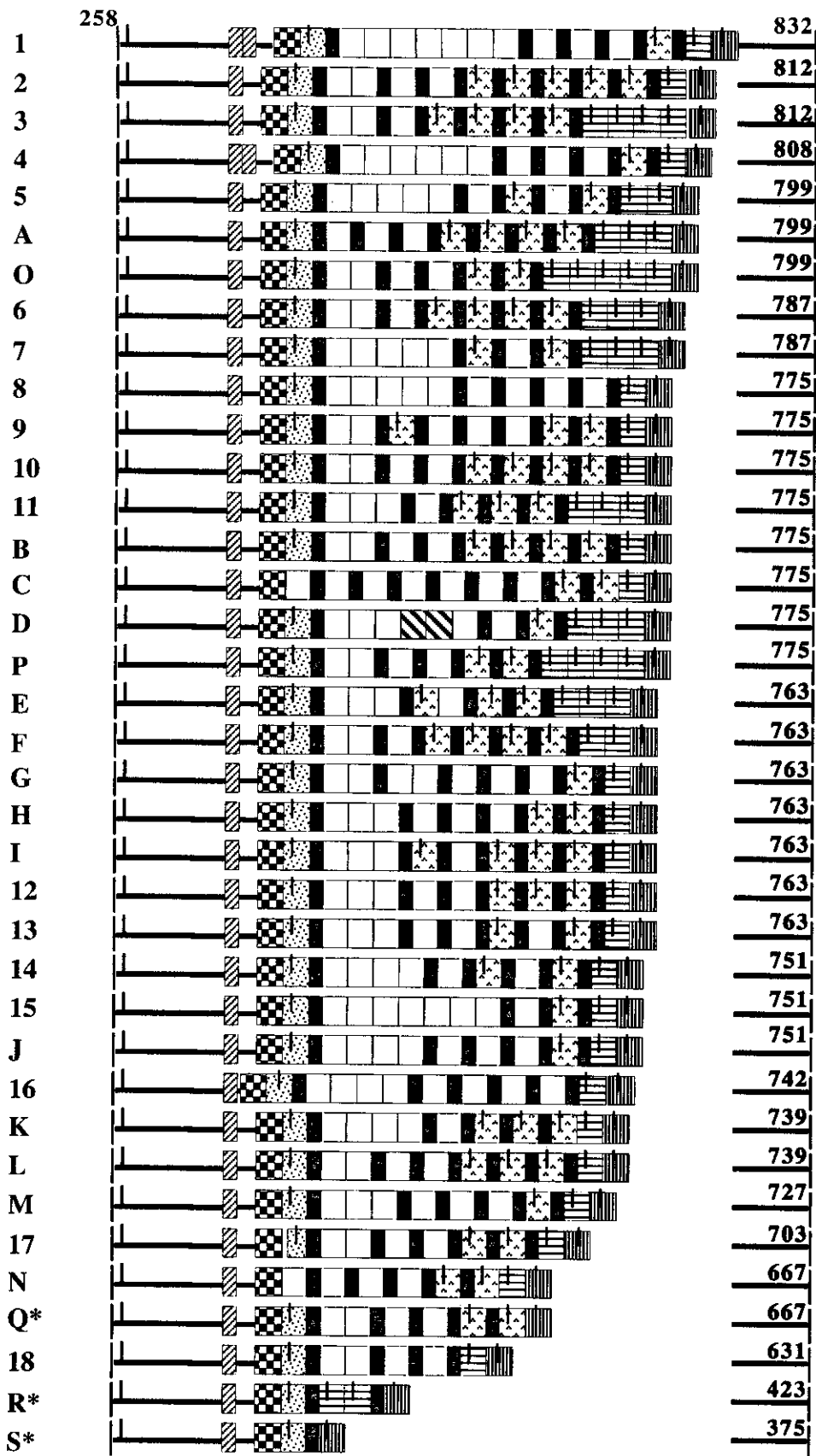
^eND, 解析せず

^fIrre, 無関係のバンドのみ検出された

^gMixed, シーケンスの結果バンドが混合していると考えられた

图 1





I Alu I restriction sites (AG!CT)

▨ N E D
AATGAAGAT

▩ E K A S S S D N S
GAAAAAGCAAGTTCAAGTGATAACTCA

▤ E S S S S D K P
GAATCAAGCTCAAGTGATAAACCA

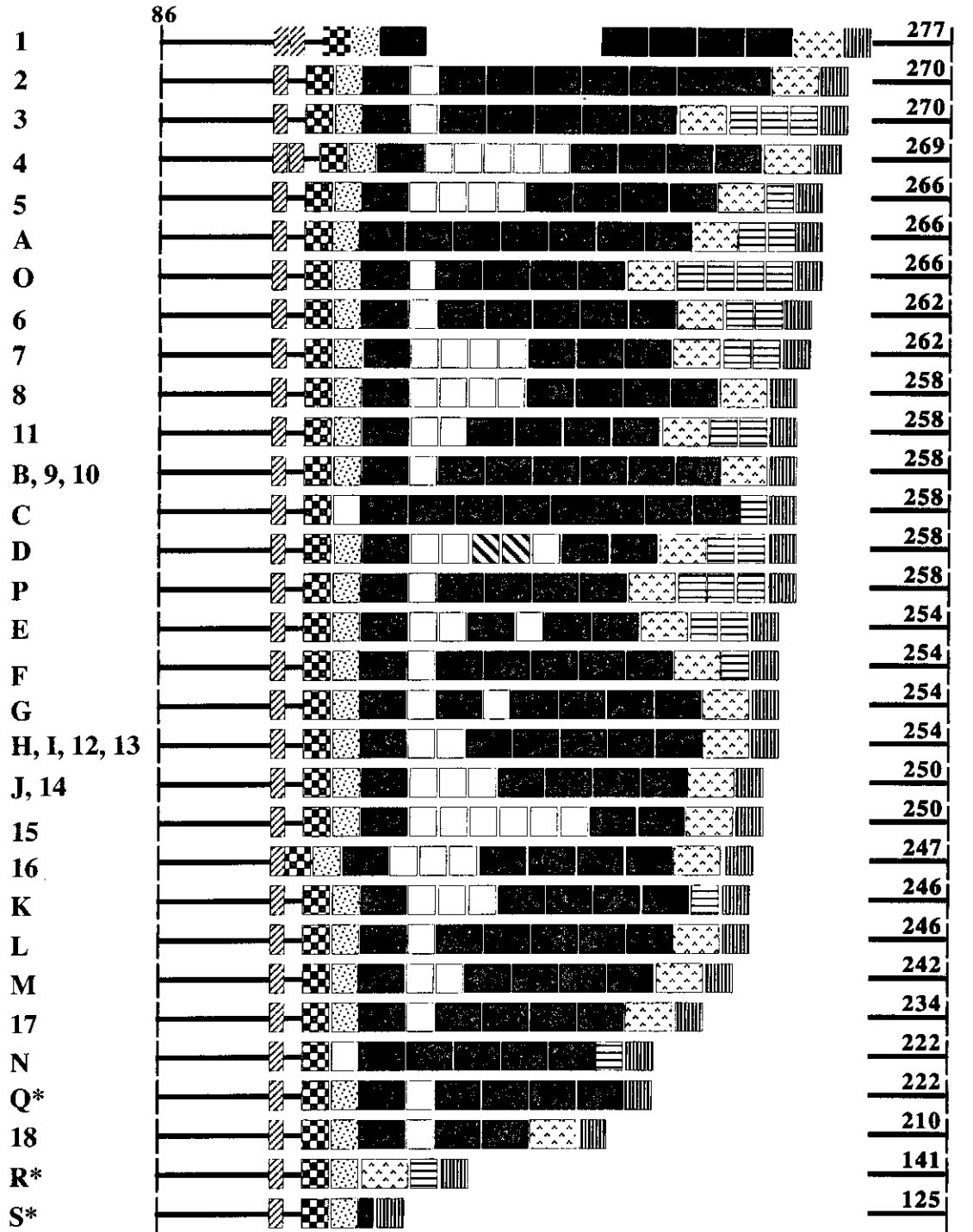
■ D N K P
GATAATAAACCA


E A S S S D K P
GAAGCAAGTTCAAGTGATAAACCA
▤ GAAGCAAGCTCAAGTGATAAACCA

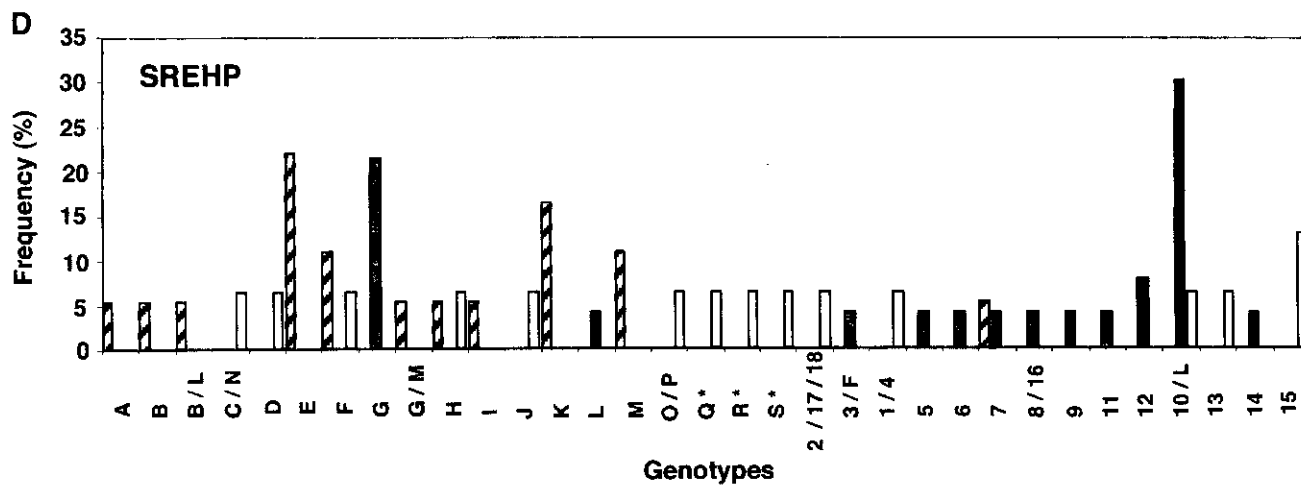
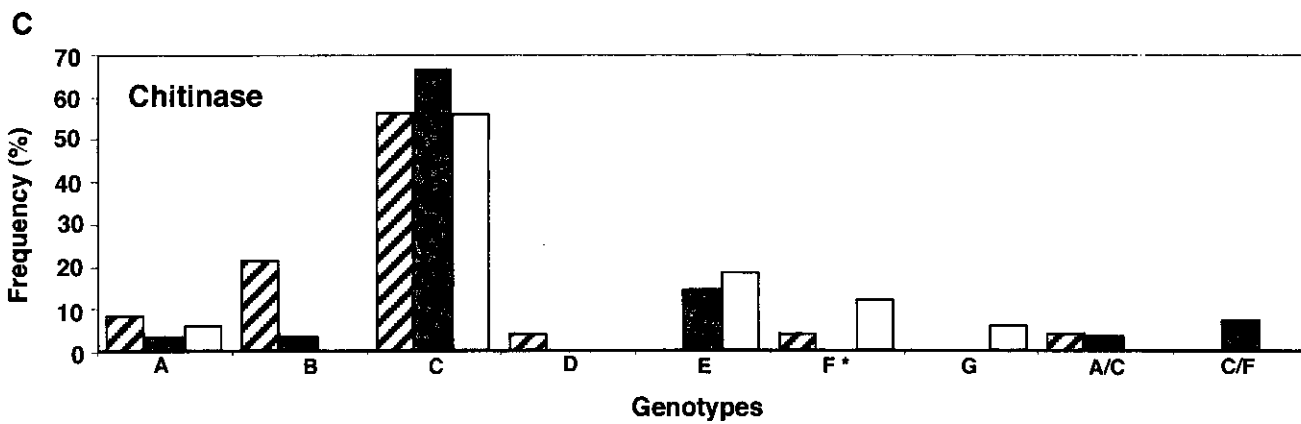
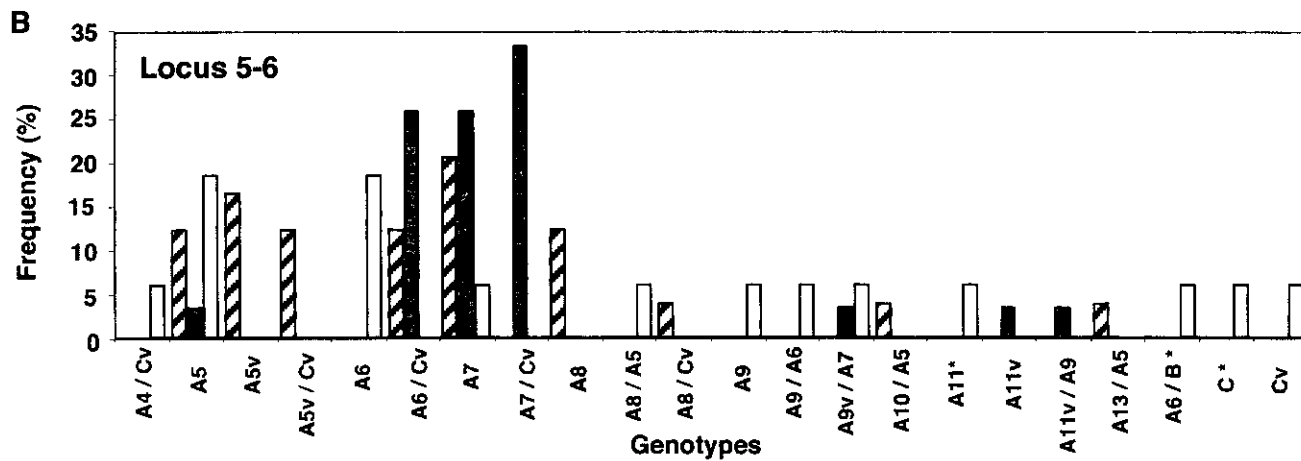
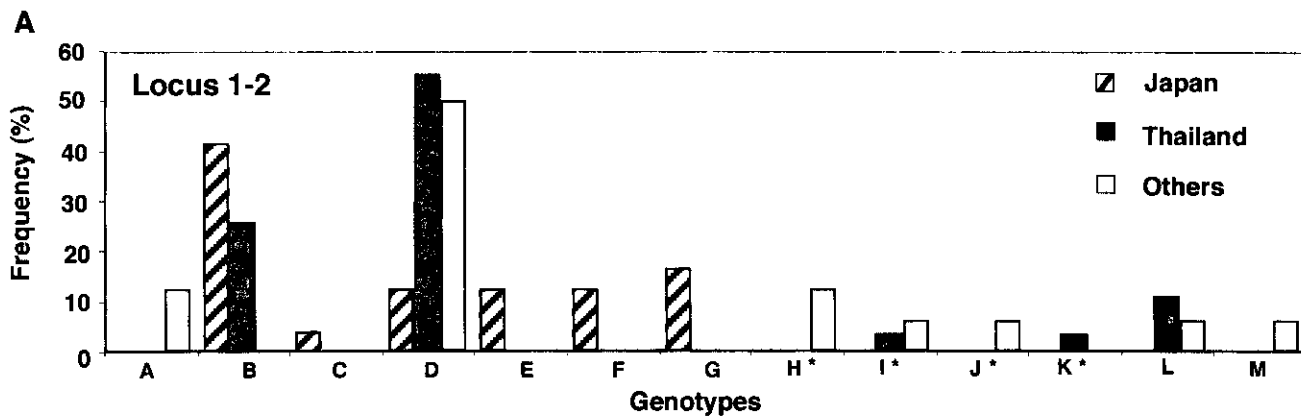
E A S S S D K S
▩ GAAGCAAGTTCAAGTGATAAATCA

E A S S T N K P
▤ GAAGCAAGCTCAACTAATAAACCA

E A S S T S N S
▩ GAAGCAAGCTCAACTAGTAATTCA



	N E D		D N K P E A S S S D K P
	E K A S S S D N S		D N K P E A S S T N K P
	E S S S S D K P		E A S S T N K P
	E A S S S D K P		E A S S T S N S
	E A S S S D K S		D N K P



20020590

P.36以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.10-P.11の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。