

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、及び脱嚢後発育の阻害薬開発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 赤痢アメーバのヒトへの感染は成熟嚢子の経口摂取によるが、摂取された嚢子の脱嚢・発育により栄養型が形成され感染が成立する。即ち、脱嚢ならびに脱嚢したアメーバ (metacystic amoebae) の発育は感染にとって必須の過程であり、それ故感染予防の重要な標的に成ると考えられる。本研究では、各種阻害剤を用いて脱嚢・発育機構の解明を行うとともに、それを通じた感染予防のための標的の探求を行った。アクチン機能阻害剤 latrunculin A および jasplakinolide により脱嚢・発育が阻害されたことから、アクチン細胞骨格の関与が明らかになったが、cytochalasin D は意外にも、両過程に対し促進効果を示した。これが低濃度で起こることから、この効果はアクチン系に対する作用とは別の作用により、脱嚢に関連した遺伝子の活性化が引き起こされることが示唆された。また、他の cytochalasin (A、B、E) にはこの促進効果は認められなかった。セカンドメッセンジャーあるいはシグナル伝達分子として多くの細胞機能を担うカルシウムイオン (Ca^{2+}) およびその細胞内レセプターであるカルモデュリン (CaM) に注目し、これらの阻害剤の効果を調べた結果、 Ca^{2+} キレート剤 EGTA、EDTA、細胞内 Ca^{2+} flux の阻害剤 TMB-8、 Ca^{2+} channel blocker である bepridil、CaM 阻害剤 trifluoperazine が脱嚢・発育過程を阻害することが判明し、 Ca^{2+} /CaM 阻害剤の有用性が示唆された。両過程は DNA ポリメラーゼ阻害剤 aphidicolin により阻害されたが、これと栄養型および嚢子に対する抗血清を用いた免疫プロットイングにより、4核のアメーバから1核のアメーバへの細胞分裂を伴う発育過程で遺伝子発現の変化が起こることが明らかになった。脱嚢・発育の誘導に関与する情報伝達系を明らかにするため情報伝達分子 protein kinase C (PKC) および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) に注目し 阻害剤の効果を調べた結果、両過程とも阻害されることが判明し、PKC および PI3K の関与が示唆された。

A. 研究目的

アメーバの脱嚢および脱嚢したアメーバの発育は感染の成立のために必須な過程であり、この過程を遮断することは感染成立の阻止に通じる。それ故、この過程の機構の解明ならびに阻害剤の探求は感染予防法の確立のために重要である。赤痢アメーバは in vitro における嚢子形成系が未確立のため、嚢子形成機構とともに脱嚢機構もほとんど

明らかでない。この点で赤痢アメーバの嚢子形成のモデルになっている *Entamoeba invadens* の脱嚢系は赤痢アメーバの脱嚢のモデルとしても重要である。本研究では *E. invadens* の in vitro 脱嚢系を用い、以下の項目につき各種阻害剤の効果を検討した。
1) アクチン細胞骨格系の関与の検討: アクチン機能阻害剤の効果を調べる。2) カルシウムイオン (Ca^{2+}) およびその細胞内レセプタ

一であるカルモデュリン (CaM) の関与の検討: Ca^{2+} キレート剤、細胞内 Ca^{2+} flux の阻害剤、 Ca^{2+} チャンネルブロッカー、CaM 阻害剤の効果を調べる。3) DNA ポリメラーゼ/DNA 合成との関連の解析: DNA ポリメラーゼ阻害剤 aphidicolin の効果を調べる。4) 脱囊・発育過程における遺伝子発現の変化の解析: 調製した栄養型および囊子に対するポリクローナル抗体を用い、イムノブロッティングにより解析する。5) 脱囊・発育過程における情報伝達系の解析: 脱囊・発育に関与する情報伝達系を明らかにするため細胞内シグナル伝達分子として重要な protein kinase C (PKC) および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 阻害剤を用いてその関与を検討する。

B. 研究方法

E. invadens 栄養型を囊子形成液に移し3日間培養することにより囊子を得、この囊子を栄養型培養液に戻すことにより脱囊を誘導した。その後3日間、脱囊したアメーバ (metacystic amoebae) の数をカウントし、また虫体当りの核数を求めた。イムノブロッティングは常法に従い、栄養型ならびに囊子に対する兔抗血清を用い、また囊子抗血清を栄養型抗原で吸収した抗血清も用いた。各種阻害剤としてアクチン機能阻害剤 latrunculin A、jasplakinolide、cytochalasin A、B、D、E、 Ca^{2+} キレート剤 EGTA、EDTA、 Ca^{2+} flux の阻害剤 TMB-8、 Ca^{2+} channel blocker bepridil、CaM 阻害剤 trifluoperazine、DNA ポリメラーゼ阻害剤 aphidicolin、PKC 阻害剤 staurosporine、chelerythrine、calphostin C、*D-erythro*sphingosine および PI3K 阻害剤 wortmannin を用いた。

C. 研究結果

1) アクチン機能阻害剤の効果: 用いた3種のアクチン機能阻害剤のうち cytochalasin と latrunculin A はアクチンの重合阻害作用があり、jasplakinolide は逆にアクチンの重合促進安定化があることが明らかになっている。latrunculin A と jasplakinolide は対照に比しアメーバ虫体数を濃度に依存して減少させ、阻害効果を示したが、cytochalasin D は逆に虫体数を増加させ、促進効果を示した。発育に対する効果も同様であった。一方、cytochalasin A、B、E に促進効果は認められず、cytochalasin E は脱囊・発育を抑制した。この結果から、cytochalasin D は予想に反し、latrunculin A および jasplakinolide と異なり、脱囊・発育を促進する作用があることが判明した。

2) Ca^{2+} /CaM 阻害剤の効果: 種々の濃度の Ca^{2+} キレート剤 EGTA、EDTA 存在下で脱囊したアメーバ虫体数を比較した結果、EGTA 1-10 mM の濃度でほぼ同様な虫体数の減少が認められ、EDTA では濃度に依存した虫体数の減少が認められた。EDTA のほうが EGTA よりも強い阻害効果を示した。囊子の生存率は高濃度のキレート剤存在下で減少した。脱囊したアメーバの発育をその核数により調べた結果、EGTA は発育を遅延させ、EDTA は発育異常を引き起こした。これらのキレート剤の除去により虫体数の部分的な回復が認められた。 Ca^{2+} flux の阻害剤 TMB-8 も両過程に対する阻害効果を示したが、囊子の生存率には影響しなかった。 Ca^{2+} channel blocker である bepridil は両過程を阻害し、高濃度では囊子の生存率を減少させた。また、bepridil の除去によりアメーバ虫体数の回復が認められた。CaM 阻害剤 trifluoperazine (TFP) も両過程に

対する阻害効果を示し、bepriidil の場合と同様、TFP の除去によりアメーバ虫体数の回復が認められた。

3) DNA ポリメラーゼ阻害剤の効果：種々の濃度の DNA ポリメラーゼ阻害剤 aphidicolin 存在下で脱囊したアメーバ虫体数を比較した結果、濃度に依存した虫体数の減少が認められた。発育に対する効果を調べた結果、aphidicolin 存在下では培養3日目でも4核のアメーバの割合が対照に比しはるかに高く、発育の阻害が認められた。aphidicolin を培養1日目に除去することにより虫体数が回復したことから、その効果は可逆的であった。

4) 脱囊・発育に伴う遺伝子発現の変化：栄養型、囊子に対する兎抗血清ならびに栄養型抗原で吸収した囊子抗血清を用いたイムノブロットイングにより虫体タンパク質の変化を調べた結果、aphidicolin 存在下で高い割合を占める4核のアメーバには88kDa および66 kDa の囊子特異的タンパク質が存在するが、対照の培養3日目で大部分を占める1核のアメーバには存在せず、この過程で遺伝子発現の変化が起きていることが明らかになった。

5) 情報伝達系の解析：細胞内シグナル伝達分子 protein kinase C (PKC) の阻害剤 staurosporine、chelerythrine、calphostin C および *D-erythro-sphingosine* の効果を調べた結果、staurosporine、chelerythrine、calphostin C は対照に比し濃度に依存してアメーバ虫体数を減少させたが、*D-erythro-sphingosine* は阻害効果を示さなかった。囊子の生存率には影響を及ぼさなかったことから、staurosporine、chelerythrine、calphostin C の阻害効果は囊子への細胞障害効果によるものではないと考えられた。

staurosporine、chelerythrine、calphostin C は対照に比し発育も遅延させた。phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 阻害剤 wortmannin も同様に脱囊ならびに発育に対して阻害効果を示した。

D. 考察

アクチン機能阻害剤 latrunculin A および jasplakinolide により脱囊・発育が阻害されたことから、アクチン細胞骨格の関与が明らかになったが、cytochalasin D は意外にも、両過程に対し促進効果を示した。他の cytochalasin にこの効果は認められないことから、cytochalasin D に特有の化学構造に由来すると考えられた。アメーバの増殖および囊子形成に対して cytochalasin D が阻害効果を示すことはすでに明らかにしているが、これよりもより低濃度で起こることから、この促進効果はアクチン系に対する作用とは別の作用によると考えられ、この作用により脱囊に関連した何らかの遺伝子の活性化が引き起こされたと考えられる。脱囊関連遺伝子の同定・解析を進めるうえでこの系は重要であり、かつ有用であると考えられる。Ca²⁺/CaM 阻害剤により脱囊・発育が阻害されたことから、両過程への Ca²⁺/CaM の関与が示唆された。今回用いた実験系は囊子を囊子形成液から栄養型培養液へ移すことにより脱囊を誘導する系であり、この変換は Ca²⁺濃度の上昇を伴う。この上昇が Ca²⁺キレート剤によって阻止されたことにより抑制が引き起こされたと考えられる。これはアメーバ虫体内の Ca²⁺flux、Ca²⁺channel、CaM と関連し、これらも脱囊・発育に関与していることが示唆された。脱囊・発育過程が DNA ポリメラーゼ阻害剤 aphidicolin により阻害された点に関し、

脱囊過程は核分裂をとまわず、この過程における DNA 合成に関してはさらに検討する必要がある。一方、発育過程は核分裂・DNA 合成を含み、これは aphidicolin の標的になる。aphidicolin により核分裂が阻害され、4 核のアメーバを多く含む画分を得ることができ、これにより 1 核のアメーバと生化学的な比較が可能となり有用である。このようにして得られた両アメーバのイムノブロッティングによる比較結果は 4 核アメーバには囊子由来の囊子特異抗原が存在するが、1 核アメーバにはもはやそれらは存在せず、栄養型とほぼ同様な抗原性をもつようになり、発育過程における遺伝子発現の変化が明らかになった。囊子形成における情報伝達系として PKC および PI3K の関与はすでに明らかにしたが、今回の両阻害剤を用いた結果は脱囊・発育過程にも両情報伝達系分子が関与していることを示唆している。

E. 結論

赤痢アメーバの脱囊・発育の重要なモデルである *E. invadens* の in vitro 脱囊系を用い、種々の阻害剤の効果を検討することにより脱囊・発育機構の解明を行った。その結果、アクチン系の関与が明らかになったが、cytochalasin D には脱囊・発育の促進効果があることが判明した。脱囊・発育への Ca^{2+} 、 Ca^{2+} flux、 Ca^{2+} channel および CaM の関与が示唆された。DNA ポリメラーゼ阻害剤により、発育とともに脱囊も阻害された。細胞分裂を伴う発育過程において遺伝子発現の変化が明らかになった。情報伝達分子 PKC ならびに PI3K の両過程への関与が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2003) *Entamoeba invadens*: Inhibition of excystation and metacystic development by aphidicolin. Exp. Parasitol. 103, 61-67.
- 2) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2003) Involvement of signaling through protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase in the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. 91, 204-208.
- 3) Kumagai M, Makioka A, Takeuchi T, Nozaki T (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyl transferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 279, 2316-2323.
- 4) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T (2004) Different effect of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. Parasitol. Res. in press

2. 学会発表

- 1) Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Inhibitory effect of aphidicolin on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*. International Conference on Anaerobic Protist. Hiro. 2003年7月.
- 2) Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T. Molecular cloning and characterization of geranylgeranyl

transferase type I from *Entamoeba histolytica*. 第39回日米医学協力寄生虫疾患専門部会日米合同会議. Charlotteville. 2003年9月.

3) 牧岡朝夫、熊谷正広、渡辺直熙、小林正規、竹内 勤. *Entamoeba* の脱囊および発育へのカルシウムイオンおよびカルモデュリンの関与. 第44回日本熱帯医学会大会. 北九州市. 2003年10月.

4) 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特異性. 第44回日本熱帯医学会大会. 北九州市. 2003年10月.

5) Makioka A, Kumagai M, Takeuchi T, Nozaki T. Molecular cloning and characterization of geranylgeranyl transferase-I from *Entamoeba histolytica*. 第76回日本生化学会大会. 横浜. 2003年10月.

6) 牧岡朝夫、熊谷正広、小林正規、竹内勤. *Entamoeba* の脱囊および発育へのカルシウムイオンおよびカルモデュリン阻害剤の効果. 第36回日本原生動物学会大会. 東京. 2003年11月.

7) 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特性. 第36回日本原生動物学会大会. 東京. 2003年11月.

8) 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26回日本分子生物学会大会. 神戸. 2003年12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解析及びそれに基づくハイリスク群の疫学的研究、特に進入経路の検討、及び病原性との相関に関する研究

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並びに国内での感染経路を簡便に追跡する分子疫学的手法を開発するとともに、多型性を示す赤痢アメーバ株と病原性との相関を確立することを目的として研究を行った。これまで国内外の分離株を用いて、4つのDNA領域(Locus 1-2, 5-6, SREFP, キチナーゼ)を用いた高解像度タイピングを達成しているが、解糖系酵素の電気泳動による従来のザイモデーム解析との分子レベルでの相関が得られていなかった。そこで、赤痢アメーバのグルコースリン酸イソメラーゼ(GPI)を標的としてPCRベースの簡便なザイモデーム解析を可能とすることを長期的目標として、本年度はまず、代表的なザイモデームを示す分離株から複数のGPI遺伝子を分離し、その遺伝子・アミノ酸配列を決定した。得られた結果は原虫の粗抽出液を用いた従来のザイモデーム解析で見られる結果と良く相関しており、時間・労力・経験を必要としたザイモデーム解析を、将来、簡便な遺伝子解析によって置換できると予想された。以上の結果もとに、来年度はPCRにより得られたGPIシーケンスを配列決定をすることなく、核酸配列特異的PCR或いはRFLPを用いて簡便にザイモデームを確定できるシステムを構築する予定である。ザイモデーム解析は長い間、赤痢アメーバタイピングのゴールドスタンダードと考えられており、本研究はこれを簡便化したことにより、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と考えられる。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は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を引き起こしている。現在のアメーバ症の流行、特に施設における濃厚な感染が継続的に起こっている理由の一つは、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、僅かに5-10%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、我々はこれまで精力的に研究を展開してきた。特に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を用いた高分離遺伝子タイピングにより、国内外の分離株を詳細に分離することが出来た。しかしながら、従来赤痢アメーバ株のタイピングに用いられている培養原虫の粗抽出液を材料として用いた電気泳動による解糖系酵素のザイモデーム解析との相関は得られていなかった。そこで今回、4種の解糖系酵素の中でザイモデーム解析レベルで最も多型性の高いグルコースリン酸イソメラーゼ(GPI)を標的と

して、そのザイモデーム解析に取って代わる簡便なタイピング法を開発するための研究を行った。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ株

4種類の代表的ザイモデームを有する株、HM1:IMSS cl6 (zymodeme II), SAW1627 (II α -), SAW755 (XIV), KU2 (XIX)を用いた。培養はDiamondのBI-S-33培地を用いた無菌培養及びRobinson培地を用いた細菌共生培養により行った。

2. 赤痢アメーバ株からのDNAの抽出

無菌培養或いは細菌共生培養された細胞は1000g、5分の遠心で沈渣とした。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

大腸菌及び人のGPIアミノ酸配列を基にtblastn検索により、赤痢アメーバゲノムデータベースからHM1:IMSS cl6のゲノム上のGPI遺伝子を獲得した。この配列をもとにセンス及びアンチセンスプライマーを合成した。PCR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

PCR産物はアガロース電気泳動で分離した後、GeneClean kit II (BI0101)を用いて精製した後、BKL kit (Takara)で処理し、pBluescript(Stratagene)にクローニングした。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。シーケンスプライマーは、T3, T7の他、適当な6種類の内部プライマーを用いた。得られたシーケンスはDNASYS software (Hitachi)を用いて解析した。それぞれの核酸・アミノ酸配列のデータはGenBank/EMBL/DDBJデータベースに登録予定である。

(倫理面への配慮) 本研究に関わるDNA組換え実験の許可は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. 赤痢アメーバ株におけるGPI核酸配列の遺伝的多型

それぞれの株から4-6種のクローンをランダムに選択し、全長をシーケンスした。その結果、それぞれの株に2種類の対立遺伝子と考えられる遺伝子が見つかった。それぞれの配列の相違点だけを示したものが図1である。タンパク質コード領域はいずれも全長1641bpで同一であった。核酸の多型はそのうち8か所で見られた。対立遺伝子の2型はザイモデームの異なる3株に見られた。

Comparison of GPI nucleotide sequences

Allele	1	A42	G94	C432	C582	T741	A753	A825	C1355	1641
HM1 (II)	1	A42	G94	C432	C582	T741	A753	A825	C1355	
	2	G42	G94	C432	T582	A741	A753	G825	C1355	
SAW1627 (II α -)	2	G42	G94	C432	T582	A741	A753	G825	C1355	
	3	A42	G94	C432	C582	T741	A753	A825	C1355	
SAW755 (XIV)	4	G42	G94	C432	C582	A741	T753	G825		
	5	A42	G94	C432	C582	T741	A753	A825		
KU-2 (XIX)	2	G42	G94	C432	T582	A741	A753	G825	C1355	
	6	G42	G94	T432	T582	A741	T753	G825		

図1 GPI 核酸配列の株間比較

2. 赤痢アメーバ株における GPI アミノ酸配列の多型

1 で得られた核酸配列をもとにアミノ酸配列を得るとともに、その pI 値を得た。

Comparison of GPI protein sequences

Allele	1	E32	R449	Theoretical pI
HM1 (II)	1	E32	R449	6.91
	2	E32	R449	6.91
SAW1627 (II α -)	2	E32	R449	6.91
	3	Q32	R449	7.15
SAW755 (XIV)	4	E32	R449	6.73
KU-2 (XIX)	2	E32	R449	6.91
	6	E32	R449	6.73

図2 GPI アミノ酸配列の株間比較

図2 で示されたように、4 株全体として 3 種類のアイソエンザイムが存在することが明らかとなった。これらの 3 種類のアイソエンザイムの pI は 6.73 から 7.15 までであった。HM1 及び SAW755 に存在する 2 種類の対立遺伝子のコードするタンパク質 I は同一であり (pI はそれぞれ 6.91 と 6.73)、ザイモデーム解析で 1 種類のバンドが検出される事実と対応していた。一方、ザイモデーム II α -及び XIX では 2 種類の異なる pI を示すアイソエンザイムが存在した。

3. 赤痢アメーバ GPI 遺伝子の遺伝的

距離

ClustalW を用いた系統解析により得られた 8 種類のヌクレオチド配列の遺伝的距離を計算した。解析にはタンパク質コード領域の 1641 残基を用いた。

図3 で示すように対立遺伝子の 1, 3, 5 型と 2, 4, 6 型は大きく 2 つのグループを構成する。或いは 2 型は更に独立している可能性が高い。最も頻繁に見られる 2 型は決してすべての遺伝子型から等距離にあるのではなく、4, 6 型により近い。以上の知見からは分岐のタイミングを間違いなく演繹することは出来なかった。

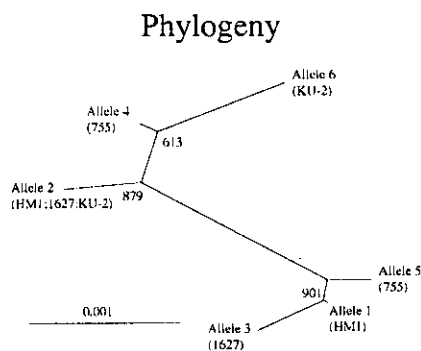


図3 GPI 核酸配列の系統樹解析

D. 考察

我々の昨年度までの成果で示したとおり、PCR とシーケンシングによる高分解能の赤痢アメーバ分離株タイピング法により、国内外の分離株をほぼクロールなレベルまで鑑別することが可能となった。しかしながら、高度なタイピングは逆に分離株を分類しすぎるという皮肉な結果を生んだ。更に、これまで歴史的に赤痢アメーバ分離株のタイピングに用いられてきた定法であるザイモデーム解析との相関が明らかにされていなかった。本研究ではザイモデーム解析の結果を遺伝子・タンパク質レベルで理解するための重要な知見を与えたと思われる。

我々は4種類のザイモデームを示す4株から計6種類の対立遺伝子、3種類のアミノ酸を得た。ザイモデームII及びXIVを示す赤痢アメーバ株では1種類のGPIタンパク質、II α -, XIXを示す株では2種類のタンパク質をもつことが明らかとなった。従来の電気泳動によるザイモデーム解析によるとII, XIVでは1本のバンドが、II α -では2本、XIXでは3本のバンドが検出されている。GPIがホモ或いはヘテロ二量体構造を取るとすると、この結果はよく当てはまる。II α -で2本のバンドしか検出されない理由はスターチゲル電気泳動法の分解能の問題であったと想像される。

本年度の研究により初めて赤痢アメーバ株タイピングの標準方法であったザイモデーム解析の分子論的裏付けが得られた。今後この結果を応用し、更に、煩雑な核酸配列の決定なしにザイモデームの決定に至る簡便な方法を構築したい。それには塩基配列特異的なPCRプライマーの設計、PCR後の制限酵素処理によるRFLPの解析などにより、簡便で安価なザイモデーム解析の方法を開発することを目指している。

E. 結論

本年度の研究により、ザイモデーム解析の分子基盤が確立され、今後への臨床・疫学研究への応用が期待される。分離株の病原性の評価に繋がる可能性のある遺伝子座の多型性の評価・解析は、我が国に浸淫する赤痢アメーバ株の国内への流入経路、国内における感染源の特定に有効であるだけでなく、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。更に、今後病原機構の中心を果たす分子の特定化にも繋がるかもしれない。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文

- i. Haghghi, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Thammapalerd, N., and Nozaki, T. (2003) Geographic diversity of genotypes among *Entamoeba histolytica* field isolates. J. Clin. Microbiol., 41, 3748-3756.
- ii. Dvorak, J.A., Kobayashi, S., Nozaki, T., Takeuchi, T., and Matsubara, C. (2003) Induction of permeability changes and death of vertebrate cells is modulated by the virulence of *Entamoeba* spp. Isolates. Parasitol. Int. 52, 169-173.
- iii. Kawazu, S, Nozaki, T., Tsuboi, T., Nakano, Y., Komaki-Yasuda, K., Ikenoue, N., Torii, M., and Kano, S. (2003) Expression profiles of peroxiredoxin proteins of the rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii*. Int. J. Parasitol. 33, 1455-1461.
- iv. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and structural characterization of NADPH-dependent D-glycerate dehydrogenase from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. Biochem. J. 375, 729-736.
- v. Tokoro, M., Kobayashi, S., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) A novel sulfur-containing amino acid degradation enzyme methionine γ -lyase from the

- enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 278, 42717-42727
- vi. Ghosh, S., Chan, J., Lea, C.R., Meints, G.A., Lewis, J.C., Tovian, Z., Flessner, R., Loftus, T.C., Bruchhaus, I., Fradley, K.L., Kendrick, H., Croft, S., Kemp, R., Kobayashi, S., Nozaki, T., and Oldfield, E. (2004) Effects of Bisphosphonates on the Growth of *Entamoeba* and *Plasmodium* species *in vitro* and *in vivo*. J. Med. Chem. 47, 175-187.
- vii. Kumagai, M, Makioka, A., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2004) Molecular cloning and characterization of a protein farnesyltransferase from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem. 279, 2316-2323.
- 和文
- i. 野崎智義 (2003) アメーバ赤痢 in 動物由来感染症 その診断と対策 神山恒夫・山田章雄編 真興交易、pp244-249.
- ii. 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバのゲノムと病原遺伝子 細胞工学 第22巻, 11号, 1160-1163.
- iii. 野崎智義 (2003) 話題の抗微生物薬をめぐって 赤痢アメーバ症 臨床と微生物 第30巻, 631-636.
2. 学会発表
- i. 中野由美子、岡田麻美、ぬで島麻衣、野崎智義 (2003) 赤痢アメーバの貪食における EhRab7 ならびに EhRab11 アイソタイプ 第56回日本細胞生物学会大会 大津 May 14-16, 2003.
- ii. Nozaki, T. (2003) Functional characterization of a complex associated with small GTPase Rab7, which plays an important role in phagocytosis. EMBO Workshop on pathogenesis of amebiasis: from genomics to disease Paris, May 19-21, 2003.
- iii. 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバゲノミクス 第11回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.
- iv. 岡田麻美、Chris D. Huston, 中野由美子、Barbara Mann、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバのファゴソームバイオジェネシス 第11回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.
- v. 津久井久美子、中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2002) 赤痢アメーバの貪食の調節機構の解明 第11回分子寄生虫学ワークショップ 蓼科 Aug 2-5, 2003.
- vi. Ali, V., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Molecular and biochemical characterization of phosphoglycerate dehydrogenase and D-glycerate dehydrogenase of serine metabolic pathway from the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 Aug 25-28,

- 2003.
- vii. Nozaki, T., Ali, V., Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2003) Molecular and biochemical characterization of iron-sulfur cluster biosynthesis in the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第3回あわじしま感染症・免疫フォーラム 淡路島 Aug 25-28, 2003.
- viii. Makioka, A., Kumagai, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) Molecular cloning and characterization of geranylgeranyltransferase I from *Entamoeba histolytica*. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2003.
- ix. Nozaki, T., Okada, M., Nakada-Tsukui, K., Shigeta, Y., Nudeshima, M., Tokumaru, F., and Saito-Nakano, Y. (2003) Functional characterization of roles of Rab7 isotypes and Rab7-binding proteins during phagocytosis. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2002.
- x. Okada, M., Saito-Nakano, Y., Huston, C.D., Mann, B.J., and Nozaki, T. (2003) Proteomics analyses of phagosome proteins from *Entamoeba histolytica*. Thirty-eighth Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, Charlottesville, Virginia, U.S.A., Sept 8-9, 2003.
- xi. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Nakada-Tsukui, K., Shigeta, Y., and Nozaki, T. (2003) Rab5 and Rab7 play unique roles in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. The 14th Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, MA, U.S.A., Sept 14-18, 2002.
- xii. Makioka, A., Kumagai, M., Takeuchi, T., and Nozaki, T. (2003) Molecular cloning and characterization of geranylgeranyltransferase I of *Entamoeba histolytica*. 第76回日本生化学会大会 2003年10月15-18日、横浜
- xiii. Okada, M., Huston, C., Saito-Nakano, Y., Yasuda, T., Mann, B., and Nozaki, T. (2003) Identification of phagosomal proteins in *Entamoeba histolytica*. 第76回日本生化学会大会 2003年10月15-18日、横浜
- xiv. Nozaki, T., Ali, V., Tokumoto, U., and Takahashi, Y. (2003) Molecular analysis of iron-sulfur cluster formation in the enteric parasitic protist *Entamoeba histolytica*. 第76回日本生化学会大会 2003年10月15-18日、横浜

- xv. 野崎智義, Vahab Ali, 徳本梅千代, 高橋康弘 (2003) 腸管寄生原虫赤痢アメーバの鉄硫黄クラスター生合成マシナリーの同定と機能解析 第 2 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2003 年 10 月 31 日、金沢
- xvi. 牧岡朝夫, 熊谷正広, 竹内勤, 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバのファルネシル転移酵素の解析 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10-13 日、神戸
- xvii. 津久井久美子, 中野由美子, 岡田麻美, 繁田泰男, 野崎智義 (2003) 赤痢アメーバ Rab 結合分子の検索 第 26 回日本分子生物学会年会 2003 年 12 月 10-13 日、神戸
- xviii. 野崎智義 (2004) 腸管寄生原虫赤痢アメーバの含硫アミノ酸代謝の解明と創薬 第 5 回感染症フォーラム 2004 年 1 月 19-20 日、東京

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。

20030540

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