

Nakanishi, K. (シンポジウム) (2005) The role of Interleukin 18 in the pathogenesis of bronchial asthma in animal models. 第 35 回日本免疫学会総会, 12.13-15. 横浜.

Terada, M., Tsutsui, H., Sano, H. and Nakanishi, K. (ワークショップ) (2005) Interleukin-18 is a novel therapeutic target for intrinsic atopic dermatitis induced by staphylococcal product in mice. 第 35 回日本免疫学会総会, 12.13-15. 横浜.

佐々木由紀、善本知広、丸山治彦、太田伸生、有園直樹、中西憲司 (2005) ヲエネズエラ糞線虫 (Sv) 感染防御に対する内因性 IL-18 の役割. 第 74 回日本寄生虫学会大会, 4.8-9. 米子

澤木潤子、筒井ひろ子、谷澤隆邦、中西憲司 (2005) マウス肝由来 Natural Killer 細胞クローンの Toll like receptor を介した活性化. 第 70 回インターフェロン・サイトカイン学会学術集会, 7.20-21. 京都.

Sawaki, J. Tsutsui, H., Tanizawa, T. and Nakanishi, K. (2005) Activation of NK cells through Toll-like receptors in mice. International cytokine society conference 2005, 10.27-31. Korea.

Yoshimoto, T., Sasaki, Y. and Nakanishi, K. (2005) IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by

activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity. 第 35 回日本免疫学会総会, 12.13-15. 横浜.

中西憲司 (2006) IL-18 が示すヴェネズエラ糞線虫感染防御機構の解明. 厚生労働省科学研究費・国際医学協力研究事業「寄生虫の病態・治療及び予防に関わる標的分子探索とその国際寄生虫対策への応用的展開に関する研究」平成 17 年度班会議、日米医学協力寄生虫疾患専門部会・平成 17 年度国内会議, 2.18. 東京.

H. 知的財産の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

発明者：藤元治朗、岩崎剛、中西憲司

発明の名称：選択的 Th2 免疫反応抑制剤

出願人：藤元治朗、岩崎剛、中西憲司、住友製薬株式会社

出願日：2005 年 4 月 15 日

特願 2005-118334

発明者：水谷 仁、中西憲司

発明の名称：IL-18 の生物活性を有する新規ポリペプチドおよびその利用

出願人：科学技術振興機構

出願日：2005 年 11 月 30 日

特願 2005-346987

2. 実用新案登録

3. その他

ハマダラカにおけるキサントレン酸含量の定量分析

分担研究者 松岡裕之 自治医科大学・教授

研究要旨 マラリア原虫の生殖体形成は、ヒトからハマダラカへの伝播の最初の段階であり、トリプトファンの代謝産物であるキサントレン酸 (XA) によって誘導される。私はこれまでに、1) ハマダラカは吸血の際に唾液を中腸内へ飲み下すこと、2) ハマダラカの唾液腺に XA が含まれること、を報告している。今回私は HPLC-ECD 分析によりハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の組織に含まれる微量の XA を定量する手法を確立した。この方法を用いることにより、幼虫・サナギ・成虫における XA の含有量を測定できるようになった。また唾液腺や中腸を取り出して、XA の含有量を測定することも可能となった。数回の測定結果によると XA の含有量は、幼虫～蛹では1匹あたり 20~50ng、成虫では 10~50ng であった。頭部における XA の含有量は体全体量の 70%を占め、XA が眼の色の濃さに関連していることを裏づけた。中腸の XA の含有量は 0.1~0.2ng であった。中腸のサイズの 1/20 しかない唾液腺にも 0.1~0.2ng の XA が含まれていた。吸血をさせると唾液腺における XA の量は吸血前の 50%程度に減少し、吸血に伴って唾液腺の XA が大量に消費されていることが窺われた。すなわち吸血時、蚊が唾液を飲み込むことで唾液腺の XA が中腸へ流入し、生殖体形成誘導に寄与しているのではないかと考察している。

A. 研究目的

私は何故ハマダラカだけがマラリアを媒介できるのか、という疑問を解決することを通じて、マラリアを媒介しないハマダラカを創製できないかと考えている。マラリア原虫の生殖体形成は、ヒトからハマダラカへの伝播の最初の段階であり、トリプトファンの代謝産物であるキサントレン酸 (XA) によって誘導される。私はこれまでに、1) ハマダラカは吸血の際に唾液を中腸内へ飲み下すこと、2) ハマダラカの唾液腺に XA が含まれること、を報告している。今回私は HPLC-ECD 分析によりハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の組織に含まれる微量の XA を定量する手法を確立した。

B. 研究方法

ハマダラカの幼虫・蛹・成虫をギ酸のなかでホモゲナイズし、溶け出て来た成分を遠心フィルターにより分画した。分子量 5000 以上の蛋白質はすべて除き、HPLC-ECD にかけてトリプトファンの代謝産物だけを検出するようにした。XA 特有のピークは1本であり、他のトリプトファン代謝産物と区別できることを確認した。純品 XA の濃度とピークの高さとの関係から検量線を描き、サンプルの XA 含有量を算出した。蚊の臓器 (中腸、唾液腺、マルピギー管など) については 10-20 匹分を集めてサンプルとし、XA 含有量を算定した。

C. 研究結果

数回の測定結果によると XA の含有量は、幼虫～蛹では 1 匹あたり 20～50ng、成虫では 10～50ng であった。頭部における XA の含有量は体全体量の 70%を占め、XA が眼の色の濃さに関連していることを裏づけた。中腸の XA の含有量は 0.1～0.2ng であった。中腸のサイズの 1/20 しかない唾液腺にも 0.1～0.2ng の XA が含まれていた。吸血をさせると唾液腺における XA の量は吸血前の 50%程度に減少した。ネッタイシマカでは吸血前後で唾液腺 XA の減少はみられなかった。

D. 考察

ハマダラカは吸血により唾液腺中の XA を半分程度消費してしまう。一部は吸血源動物の皮膚内に注入しているとして、一部は血液とともに中腸の中に取り込んでいるものと考えられる。ハマダラカ以外の蚊は吸血後に唾液腺 XA の減少はみられず、ハマダラカ独特の生態が認められた。

E. 結論

蚊が保有しているマラリア原虫活性化物質であるキサントレン酸 (XA) の含有量を 1 匹ずつのレベルで測定できるようになった。また唾液腺に含まれる XA の含有量は 20 匹分の唾液腺を集めることで測定できるようになった。今後ノックアウト技術により XA を産生できないハマダラカを創製してゆくことを展望したとき、XA が測定できるようになった意義は大きい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Okech BA, Arai M, Matsuoka H. The effects of blood feeding and exogenous supply of tryptophan on the quantities of

xanthurenic acid in the salivary glands of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Biochem Biophys Res Commun* 341(4): 1113-1118, 2006

2. 学会発表

新井明治, Okech BA, 松岡裕之: ハマダラカ唾液腺におけるキサントレン酸含量の定量分析 第 57 回日本衛生動物学会大会 2005 年 6 月 2-3 日 (札幌) (学会抄録集 p35)

松岡裕之, Okech BA, 新井明治: トリプトファン添加によるハマダラカのキサントレン酸含有量の変化 第 57 回日本衛生動物学会大会 2005 年 6 月 2-3 日 (札幌) (学会抄録集 p35)

服部隆太, 笠原優一, 吉田 元, 新井明治, 松岡裕之: ハマダラカにおけるキサントレン酸含量の定量分析 第 46 回日本熱帯医学会大会 2005 年 10 月 14-15 日 (京都) (学会抄録集 p83)

吉田 元, 笠原優一, 服部隆太, 新井明治, 松岡裕之: ハマダラカにおけるキサントレン酸含量とマラリアの伝播効率の関係 第 46 回日本熱帯医学会大会 2005 年 10 月 14-15 日 (学会抄録集 p84)

Okech BA, Arai M, Matsuoka H: The effects of blood feeding and exogenous supply of L-tryptophan on the salivary gland quantities of xanthurenic acid in *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 54th Annual Meeting, 11-15 December, 2005 (Washington DC, USA) (Abstract p142)

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

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立に関する研究

分担研究者 坪井敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター教授

研究要旨 コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫生殖母体特異タンパク質を網羅的に発現したところ、80種の組み換えタンパク質を可溶性画分に発現することに成功した。発現成功率は80%以上であり、熱帯熱マラリア原虫の組換えタンパク質の発現実験としては先に例を見ない結果であった。次にこれら80種の組換えタンパク質を、伝搬阻止活性が確認されている熱帯熱マラリア患者血清を用いてELISAでスクリーニングした結果、15種の生殖母体タンパク質が新規ワクチン候補抗原として選択された。今後、これらの組換えタンパク質の大量合成、特異抗体の作成を行って、各抗体の伝搬阻止活性を個別に測定する予定である。

A. 研究目的

マラリア伝搬阻止ワクチンは、それ単独でマラリアの流行を抑制できるのみならず、現在開発中の他種のマラリアワクチン及び治療薬に対する新たな耐性原虫の拡散を阻止できる点でユニークであり、カクテルマラリアワクチンの必須の構成成分と考えられている。ところが、熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補として研究が進められている抗原は現在までわずかに4種類にすぎず、未だ実用化に至ったワクチンは無い。また、そのうちの2種類は組換えタンパク質の発現すら困難で、組換えタンパク質を用いた基礎研究はほとんど進んでいない。一方、2002年熱帯熱マラリア原虫のゲノム情報が公開され、約5400個の遺伝子が予測された。そのうち200種類ものタンパク質が媒介蚊ステージで発育する生殖母体

に特異的に発現し、その中には新たな伝搬阻止ワクチン候補が含まれていると予想されている。つまり、新規の伝搬阻止ワクチン候補抗原をゲノムワイドに探索することが可能となっている。本研究課題は、伝搬阻止ワクチン候補抗原の探索をモデルに、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いたマラリアワクチン候補分子のゲノムワイドなスクリーニングシステムの確立を目的に実施した。

B. 研究方法

1) 標的分子の選択

本研究では、データベース PlasmDB (<http://plasmodb.org/>) の情報を基に、熱帯熱マラリア原虫の生殖母体で特異的に発現している遺伝子192種をワクチン候補抗原タンパク質のスクリーニングの標的に選択し、プラスミドにクローン化し

た。

2) PCR法を用いた転写鑄型の作成

タンパク質の合成に用いる mRNA の転写鑄型を作成するため、PCR 法により標的の熱帯熱マラリア原虫遺伝子を含むプラスミドクローンから各遺伝子を増幅した。引き続き、上記の PCR 産物を鑄型として再び PCR を行い、標的遺伝子に転写プロモーター配列及びコムギ無細胞タンパク質合成用の翻訳エンハンサー配列が付加された転写鑄型を作成した。

3)転写

上記の PCR 産物を鑄型として転写反応を行い、mRNA を得た。

4) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成

これらの mRNA を鑄型に用いて、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法により熱帯熱マラリア原虫遺伝子の組換えタンパク質を合成した。

5) 流行地におけるマラリア伝搬阻止患者血清の採取

タイ国メソト市のマラリア診療所において治療に訪れた熱帯熱マラリア患者の内、血流中に生殖母体の感染が確認された患者から、インフォームドコンセントを得た後原虫感染血液を採取した。これらを、タイ国における主要なマラリア媒介蚊である *Anopheles dirus* にメンブレンフィーダーを用いて実験的に吸血させた。これらの蚊をバンコクの在タイ米軍医学研究所 (AFRIMS) に持ち帰り、1週間飼育した後、感染蚊を個別に解剖して各蚊の中腸の感染オーシスト数を顕微鏡下

に算定した。これにより、オーシストの感染が確認されなかった患者の血清を、伝搬阻止患者血清とした。また、媒介蚊へのオーシストの感染が確認された患者の血清を、伝搬阻止活性のないマラリア患者血清とした。

6) 伝搬阻止ワクチン候補抗原のスクリーニング

上記で発現した組換えタンパク質を、伝搬阻止活性が確認された熱帯熱マラリア患者血清を用いて ELISA でスクリーニングした。

(倫理面への配慮)

タイ国におけるマラリア患者血液の採取に当たってはタイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。

C. 研究結果および考察

現在までに生殖母体期特異遺伝子のうち 150 種のクローンを得た。次いでこれらの cDNA クローンの内、全長の塩基配列が確認された 82 種類についてコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて発現した結果、現在までに 80 種の組み換えタンパク質を可溶性画分に発現することに成功した。現在、残りの 70 種についても組換えタンパク質の発現を実施中である。

また、伝搬阻止患者血清を 4 名分、伝搬阻止活性のないマラリア患者血清を 3 名分得ることができた。

上記で発現した 80 種の組換えタンパク質を、伝搬阻止活性が確認された熱帯熱マラリア患者血清を用いて ELISA でスクリーニングした結果、18 種の組換えタンパク質がこの血清中の抗体と反応した。また、このうちの 3 種は伝搬阻止活性のないマラリア患者血清にも反応性を示したため、残り 15 種の生殖母体タンパク質を伝搬阻止ワクチン候補分子とした。現在、これらの組換えタンパク質の大量合成、特異抗体の作成を行っており、今後各抗体の伝搬阻止活性を個別に測定する予定である。

D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、熱帯熱マラリア原虫遺伝子の組換えタンパク質をコドンの改変無く発現することに成功した。生殖母体特異タンパク質をモデルに、80 種の組換えタンパク質を網羅的に発現することに成功し、患者血清を用いた新規ワクチン抗原タンパク質のスクリーニングが可能と考えられた。上記の研究成果は今後のマラリア伝搬阻止ワクチン開発の礎石となるものであると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Rungruang, O. Kaneko, Y. Murakami, T. Tsuboi, H. Hamamoto, N. Akimitsu, K. Sekimizu, T. Kinoshita, M. Torii

Erythrocyte surface glycosylphosphatidyl inositol anchored receptor for the malaria parasite. *Mol. Biochem. Parasitol.* 140, 13-21, 2005.

- 2) O. Kaneko, B.Y.S. Yim-Lim, H. Iriko, I.T. Ling, H. Otsuki, M. Grainger, T. Tsuboi, J.H. Adams, D. Mattei, A.A. Holder, M. Torii
Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the *Plasmodium falciparum* RhopH complex. *Mol. Biochem. Parasitol.* 143, 20-28, 2005.

- 3) T. Arakawa, A. Komesu, H. Otsuki, J. Sattabongkot, R. Udomsangpetch, Y. Matsumoto, N. Tsuji, Y. Wu, M. Torii, T. Tsuboi
Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect. Immun.* 73, 7375-7380, 2005.

2. 学会発表

- 1) Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Han E-T, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y.
Wheat germ cell-free system: A

- powerful tool to identify novel vaccine candidates based on the *Plasmodium falciparum* genome database.
- ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.
- 2) Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Han E-T, Kaneko O, Torii M, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Endo Y, Tsuboi T. High-throughput screening for asexual blood stage *Plasmodium falciparum* vaccine candidates. ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.
- 3) Iriko H, Takeo S, Jin L, Kaneko O, Torii M, Sattabongkot J, Singh S, Sawasaki T, Endo Y, Tsuboi T. Screening of novel malaria transmission-blocking vaccine candidates using wheat germ cell-free protein synthesis system. ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.
- 4) Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Torii M. Gene conversion and extensive polymorphism of the RhopH1/clag family members in *Plasmodium falciparum*. ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.
- 5) Han E-T, Seok W-S, Kim Y-S, Tsuboi T, Chai J-Y. Changing patterns of the reemerging *Plasmodium vivax* malaria in the Republic of Korea. ASTMH 54th annual meeting, Washington, DC, USA, December 11-15, 2005.
- 6) 木村理沙、矢野和彦、駒木-安田加奈子、坪井敬文、鳥居本美、狩野繁之、河津信一郎
2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (PfTPx-1)欠損熱帯熱マラリア原虫のトランスクリプトーム解析
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 7) 矢野和彦、駒木-安田加奈子、大槻均、坪井敬文、鳥居本美、狩野繁之、河津信一郎
2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (TPx-1)ノックアウトがマラリア原虫の媒介蚊体内発育に及ぼす影響の解析
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 8) 前田卓哉、齋藤智也、竹尾暁、鈴木寛子、坪井敬文、河津信一郎、竹内勤、浅井隆志
熱帯熱マラリア原虫におけるアピ

- コプラスト型ピルビン酸キナーゼの解析
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 9) 大槻均、金子修、入子英幸、竹尾暁、坪井敬文、鳥居本美
ネズミマラリア原虫の赤血球結合分子相同体 EBL の局在と病原性
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 10) 梁恵賢、有末伸子、三田村俊秀、Udomsangpetch R、坪井敬文、鳥居本美、堀井俊宏
Studies of expressions and polymorphism of the SERA-homologous genes in *Plasmodium vivax*.
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 11) 入子英幸、竹尾暁、金玲、金子修、鳥居本美、坪井敬文
新規熱帯熱マラリア伝搬阻止ワクチン候補抗原のゲノムワイドな探索
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 12) 竹尾暁、入子英幸、金玲、金子修、鳥居本美、坪井敬文
熱帯熱マラリア原虫プロテインアレイを利用した新規ワクチン候補抗原分子の探索
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- 13) 佐藤暖、岡田麻美、繁田泰男、竹尾暁、坪井敬文、野崎智義
赤痢アメーバの貪食に関連したシステインプロテアーゼ及びシステインプロテアーゼ様タンパク質の解析
第 74 回日本寄生虫学会大会、米子、4/8-9、2005。
- F. 知的財産権の出願・登録状況
特記すべきものはない

寄生虫症 DNA ワクチンの研究

分担研究者 久枝 一 九州大学医学研究院助教授

研究要旨 現在においても問題となっているマラリアなどの細胞内寄生性原虫による感染症撲滅の対策として有効なワクチンの開発が期待されており、本研究では細胞内寄生虫感染症に対する DNA ワクチンの開発を試みる。

A. 研究目的

エイズ、結核、マラリアなどの難治性感染症の起因病原体は細胞内寄生性である。このような病原体に対する防御免疫には CD8⁺T 細胞が必須の役割を果たす。しかしながら、通常用いられる蛋白質とアジュバントの混合ワクチンでは CD8⁺T 細胞を活性化することは困難である。そこで分担研究者らは細胞内寄生性原虫、トキソプラズマモデルで CD8⁺T 細胞を活性化できる DNA ワクチンの開発を行った。

B. 研究方法

我々が着目したのは CD8⁺T 細胞活性化の最初のステップである抗原プロセッシングに着目した。細胞内の抗原が CD8⁺T 細胞に認識されるためには、プロテアソームによって分解されることが必須である。その分解は、分解される蛋白質にユビキチンが結合することでプロテアソームに認識されることで発動する。そこでトキソプラズマの SAG1 を標的抗原とし、それにユビキチンをあらかじめ融合させた分子を発現させると、分解が促進されその結果として CD8⁺T 細胞の活性化が効率良く行われると想定し、ユビキチン融合遺伝子を DNA ワクチンとして用いた。

全ての動物実験は九州大学倫理委員会の承認を得た後、ガイドラインに従って行われた。

C. 研究結果

マウストキソプラズマモデルにおいて、ワクチン抗原 SAG1 単独を発現させる DNA ワクチンではワクチン非投与群と同様に感染により全てのマウスが死亡した。一方、ユビキチン融合 SAG1 をコードする DNA ワクチンを用いると、80%以上のマウスで防御免疫が誘導され、感染をコントロールした。このワクチンを受けたマウスの CD8⁺T 細胞の機能を解析すると、抗原特異的な細胞傷害活性、IFN-g 産生能が著しく増強していた。ここでみられた CD8⁺T 細胞の活性化にはユビキチン融合 SAG1 がプロテアソームによって速やかに分解

されることが必要であった。

E. 結論

ワクチン抗原にユビキチンを融合させることで CD8⁺T 細胞への抗原提示に必須であるプロテアソームでの蛋白分解が速やかに起こり、その結果として CD8⁺T 細胞の活性化が効率良く起こることが明らかとなった。こうして活性化された CD8⁺T 細胞は強力な防御免疫機能を発揮する。以上のことから、我々の開発したユビキチン融合ワクチンの有効性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishii K, Hisaeda H. The involvement of immunoproteasomes in induction of MHC class I-restricted immunity against *Toxoplasma* SAG1. (2006) *Microbe Infect*, in press

Duan S, Hisaeda H. et al. The ubiquitin-proteasome system plays essential roles in presenting an 8-mer CTL epitope expressed in APC to corresponding CD8⁺T cells. *Int Immunol*, in press

Hisaeda H, et al. Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced TNFR family-related protein (GITR) during *Plasmodium yoelii* infection. (2005) *Eur J Immunol* 35: 3516-3524.

Malaria: immune evasion by parasites, Hisaeda H, Yasutomo K, Himeno K, *Int J Biochem Cell Biol*. (2005) 37: 700-706.

2. 学会発表

Hisaeda H, Himeno K. Malaria parasites activate regulatory T cells through innate immune receptors. The 16th International Congress for Tropical Medicine and Malaria. 13th September 2005, Marseille, France.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)
分担研究報告書

住血原虫の代謝メカニズム (*Trypanosoma cruzi*は感染宿主細胞にc-FLIPを大量発現させ、それを利用して細胞死シグナル伝達を阻害し、生き残る)
分担研究者 青木孝 (順天堂大学医学部教授)

研究要旨: *Trypanosoma cruzi* の感染によって、宿主細胞のタンパク分解は特異的に阻害されることを今回我々は明らかにした。特に、death receptor 経路アポトーシスの阻害因子として哺乳類細胞で唯一知っている c-FLIP は大量に蓄積し、その結果として細胞死シグナル伝達を阻害し、原虫は生き残ることができる。このような原虫による宿主細胞の分子操作と生き残りは、本原虫症(シャーガス病)の重要な原因となっている可能性が高い。

A. 研究目的

Trypanosoma cruzi は中南米でシャーガス病を引き起こす細胞内寄生原虫であり、生体内からの排除には細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が重要であるといわれている。これに対して本原虫は、感染細胞において death receptor を介するアポトーシスを特異的かつ非常に強く抑制することを我々はすでに報告した。本研究では、この特異的アポトーシス抑制にかかわる宿主細胞自身の阻害因子を探索し、その役割を解析することを目的とした。

B. 研究方法

Death receptor 経路アポトーシスの阻害因子として哺乳類細胞で唯一知っている c-FLIP に着目し、in vitro 感染細胞(コントロール: 非感染細胞)における c-FLIP の発現をノーザンブロット法、ウェスタンブロット法で測定し、原虫感染マウス心筋における in vivo の発現についても検索した。つぎに、c-FLIP タンパク質の蓄積のメカニズム、さらに RNAi による同タンパク質のノックダウンの影響について解析し、c-FLIP の重要性を追究した。

(倫理面への配慮)

本研究には人権擁護上の配慮等に関する倫理面の問題はない。動物愛護上の配慮については順天堂大学実験動物委員会の規定にもとづき、その承認を受けて研究をおこなった。

C. 研究結果

In vitro 感染細胞の c-FLIP (cellular FLICE inhibitory protein) は非感染細胞の約 11 倍上昇していた。また *T. cruzi* 感染マウス心筋の免疫組織化学的解析の結果、in vivo でも感染細胞の c-FLIP レベルは著しく上昇していた。このような in vivo および培養感染系における c-FLIP タンパクの上昇の原因を調べたところ、mRNA レベルは感染細胞および非感染細胞間で大差はなく、注目すべきこととして感

染細胞では c-FLIP のタンパク分解が特異的かつ顕著に抑制されていた。Death receptor Fas が刺激されると procaspase-8 は活性化され、活性型 caspase-8 が細胞死カスケードの引き金を引く。しかし *T. cruzi* 感染細胞では c-FLIP が蓄積しており、蓄積した c-FLIP は procaspase-8 の位置にリクルートされ、同カスケードは阻害されることが判った。さらに RNAi を用いて c-FLIP を特異的にノックダウンし、*T. cruzi* を感染させ、Fas 刺激を与えたところ、感染によって抑制されたアポトーシスは非感染細胞のレベルにまで回復した。以上より、*T. cruzi* は、宿主のアポトーシス抑制因子である c-FLIP を転写後の機構(短命の c-FLIP タンパクの分解阻害)により大量に蓄積させ、それを利用して death receptor を介するアポトーシスを抑制することが明らかとなった。

D. 考察

T. cruzi は、感染細胞自身の特異的抑制タンパク c-FLIP を大量発現させ、それは in vitro だけでなく in vivo 感染細胞でも同様であった。この大量発現は感染細胞に特異的に観察され、c-FLIP の分解阻害に基づくというユニークなものであり、本原虫が c-FLIP の特徴(短命であること)をとらえて可能になったと考えられる。実際、蓄積した c-FLIP は death-inducing signaling complex (DISC) にリクルートされ、そのために procaspase-8 の活性化、すなわち、アポトーシスの引き金が強く阻害されたと思われる。さらに c-FLIP をノックダウンすると、*T. cruzi* 感染細胞におけるアポトーシス抑制は解除されたことから、細胞死抑制による原虫の生き残りに c-FLIP は必須の役割を果たすと考えられる。シャーガス病の原因として、宿主における本原虫の長期生存が重要であるという最近の報告からみて、本研究の意義はきわめて大きいと考えられる。

E. 結論

細胞内寄生原虫 *Trypanosoma cruzi* は哺乳類細胞に侵入すると death receptor を介するアポトーシスを抑制し、生き残りをはかる。本研究ではその分子メカニズムの重要な部分を解明した。*T. cruzi* の免疫回避機構およびシャーガス病の病理の分子レベルでの解明に大きく貢献すると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashimoto M, N.-Shimada J, Aoki T:
Trypanosoma cruzi post-transcriptionally upregulates and exploits cellular FLIP for inhibition of death-inducing signal. *Mol Biol Cell*, 16, 3521-3528, 2005

Hashimoto M, Nakajima-Shimada J, Ishidoh K, Aoki T: Gene expression profiles in response to Fas stimulation in *Trypanosoma cruzi*-infected host cells. *Int J Parasitol*, 35, 1587-1594, 2005

Annoura T, Nara T, Makiuchi T, Hashimoto T, Aoki T: The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. *J Mol Evol*, 60, 113-127, 2005

Nara T, Kamei Y, Tsubouchi A, Annoura T, Hirota K, Iizumi K, Dohmoto Y, Ono T, Aoki T: Inhibitory action of marine algae extracts on the *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase activity and on the protozoan growth in mammalian cells. *Parasitol Int*, 54, 59-64, 2005

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

研究要旨

北海道に蔓延するエキノコックス（多包条虫）症に対する感染源対策および疫学調査用ツールの開発を目的に、エキノコックス感染動物の糞便を用いた DNA 診断法および野外採取糞便の糞便排泄動物の特定法について検討した。DNA 診断は糞便中に含まれる虫卵の DNA を利用すると容易に行えるが、今回は、虫卵が含まれない糞便に対する DNA 診断の信頼性について検討した。その結果、犬への感染実験により、虫卵排出前（プレパテント期）の糞便からの DNA 検出は診断法としては信頼性に欠けるが、駆虫と組み合わせると駆虫後の糞便から DNA 検出を行うことで高率に診断できる可能性が示された。また、北海道の主な食肉目動物を区別できる multiplex PCR を構築・検討したところ、野外採取糞便の糞便排泄動物を特定する方法として有用であり、本法の応用により精度の高い疫学調査が可能となることが示された。

A. 研究目的

エキノコックス（多包条虫）症は北海道全域に蔓延している人獣共通寄生虫症である。人への感染は終宿主糞便中に排泄される虫卵の摂取によって起こり、放置すると死に至る。平成16年度にはエキノコックス症の新規患者は20名が報告（届け出）され、これまでの累積患者数は482名となった。北海道では、過去10年間のキツネの感染率は40%前後を推移し、人とキツネの行動圏の重なりにより人とペットへの感染リスクが増している。これまでの調査の結果（検査希望者を対象）、北海道では飼い犬の約0.5%がエキノコックスに感染していることがわかり、また北海道から本州へ移動した犬からも感染例が見つかっている。2004年10月からは、感染症法の改正に伴って獣医師によるエキノコックス感染犬の届け出制が施行され、これまでに4例の届け出がなされた。

厚労省のガイドラインでは、犬におけるエキノコックス診断の届け出基準は、1) 虫体または片節の確認、2) 遺伝子の検出、および3) 糞便内抗原の検出（駆虫治療の結果、抗原が不検出になったものに限る）と設定されている。これに基づき、犬の診断は、まず糞便内抗原検査と虫卵検査によるスクリーニングを行い、抗原陽性かつ虫卵の検出された例については、虫卵から抽出した DNA をターゲットとして PCR 法を行って確定診断としている。しかし、実際の現場では、抗原が検出されても虫卵が検出されないケース（プレパテント期における感染など）に遭遇することが多く、駆虫による抗原の推移により判断せざるを得ない。しかしながら、糞便内抗原検査は若干の偽陽性反応を示すため、これを補うための確定診断法の開発が望まれる。

一方、エキノコックス症対策は、これまで人の診断、治療、教育に重点が置かれ、人への感染源に対する対策は遅れていた。我々は、獣医

学領域からの貢献として、主要な感染源動物であるキツネを対象に、駆虫薬散布による感染源対策を実施し成果を上げてきた。キツネの野外調査は、野外で採取した糞便を材料として実施してきたものが多いが、糞便の排泄動物の判定は、大きさ、形、内容物や匂い等に頼っており、その判定に正確性を欠いていた。

本研究では、1) 虫卵検査により検出できない感染糞便に対する確定診断法の開発、および2) 野外調査における糞便排泄動物の区別をより明確にするため、糞便内 DNA を利用した糞便排泄動物鑑別法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 虫卵検査により検出できない感染糞便に対する確定診断法の開発

本研究では特にプレパテント期（虫卵排出前の期間）における DNA 診断の可能性について検討した。実験室内で継代している原頭節を用いて犬への実験感染を行い、糞便を経時的に採取して PCR 法による DNA 検査を行った。さらに、犬への駆虫を行って、駆虫後に糞便中に排出される虫体由来の DNA 検出の可能性を検討した。

2. 糞便内 DNA を利用した糞便排泄動物鑑別法の開発

北海道において多包条虫の終宿主となるキツネ、タヌキ、イヌ、ネコおよびこれらの動物と類似の糞便を排泄するアライグマ、イタチ類のミトコンドリア DNA D-loop 領域について、増幅産物の大きさの違いで鑑別が可能となるようにそれぞれ特異的な6種類のプライマーを設計し multiplex-PCR を行った。この multiplex-PCR について、食肉目動物の糞便中に含まれる餌動物由来 DNA の影響、および糞便の野外放置による DNA 損傷について検討を加えた。さらに、野外で採取した食肉目動物の糞便を用いて開発し

た multiplex-PCR の有用性について検討した。

C. 研究結果

1. 虫卵検査により検出できない感染糞便に対する確定診断法の開発

9頭の犬と2頭の猫に1,000個から1,000,000個の原頭節を投与し、感染後20-22日目まで経時的に糞便を採取した。糞便から直接DNAを抽出し、PCRを行ったところ、多包条虫DNAはいずれの動物の糞便からも散発的に検出されただけであり、糞便からのDNA検出によりプレパテント期における確定診断を行うことは難しいことが示唆された。

3頭の犬に原頭節10,000個または100,000個を投与し、感染12日目または14日目(プレパテント期)に駆虫薬プラジカンテルを投与した。糞便から直接DNAを抽出してPCRを行ったところ、3頭全てで駆虫直後の糞便から多包条虫DNAが検出された。これらの結果から、駆虫と組み合わせたDNA検出が今後の診断法の選択肢の一つとなることが考えられた。

2. 糞便内DNAを利用した糞便排泄動物鑑別法の開発

開発したmultiplex-PCRは食肉目間で交差反応を起こさず、糞便排泄動物の鑑別が可能であることが示された。糞便に含まれる餌動物の影響についても検討したが、北海道に生息する野鼠のDNAとの交差反応は認められなかった。実験的に屋外環境で8週間放置したキツネ糞便からも10個全てのサンプルで明瞭な増幅バンドが認められ、本法の安定性が示された。小樽市および余市町で採取した147個の糞便に本法を適用したところ、140個(95%)について糞便排泄動物を鑑別することができた。以上の結果、野外採取糞便を材料とした多包条虫の動物疫学調査において、本法を併用することにより、宿主動物種を区別したより精度の高い感染率調査が実施可能となることが示された。

D. 結論

1. 終宿主動物の糞便から多包条虫DNAを検出する場合、虫卵が含まれない糞便については、プラジカンテルを投与すると寄生虫DNAが高率に検出されることが明らかとなった。

2. 北海道において多包条虫の終宿主となるキツネ、タヌキ、イヌ、ネコおよびこれらの動物と類似の糞便を排泄するアライグマ、イタチ類について、糞便内DNAを利用した糞便排泄動物鑑別法として、ミトコンドリアDNA D-loop領域を標的としたmultiplex-PCR法を開発した。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 野中成晃(2005): 飼い犬のエキノコックス感染とその診断. 獣医畜産新報, 58巻, 341-342
- 2) Nonaka, N., Kamiya, M. and Oku, Y. (2006): Towards

the control of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host in Japan. Parasitology International, 55, S263-S266

2. 学会発表

- 1) 井上貴史、金井祐太、野中成晃、片倉賢、神谷正男、奥祐三郎(2005): 北海道小樽市における駆虫薬入りベイト散布によるキツネの多包条虫感染率の低下. 第74回日本寄生虫学会大会 2005年4月8-9日, 米子市
- 2) 佐野隆史、井上貴史、福井大祐、野中成晃、片倉賢、神谷正男、奥祐三郎(2005): 野外採取した糞便の Multiplex PCR による排泄動物の鑑別—多包条虫症の動物疫学調査への応用を目的として—. 第74回日本寄生虫学会大会 2005年4月8-9日, 米子市
- 3) Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. (2005): Control options for *Echinococcus multilocularis* in Japan from the veterinary point of view. Taeniasis/Cysticercosis and Echinococcosis International Symposium with Focus on Asia and the Pacific and The Third Congress of Federation of Asian Parasitologists focused on Cestode Zoonoses. 5-8 July 2005, Asahikawa, Japan
- 4) 神廣創太、野中成晃、片倉賢、八木欣平、奥祐三郎(2005): 駆虫を組み合わせたプレパテント期における多包条虫感染の copro-DNA 診断. 第140回日本獣医学会学術集会 2005年9月29-10月2日, 鹿児島市
- 5) 野中成晃、井上貴史、佐野隆史、片倉賢、福井大祐、奥祐三郎(2005): 多包条虫疫学調査への応用を目的とした野外採取糞便の排泄動物鑑別法の検討. 第140回日本獣医学会学術集会 2005年9月29-10月2日, 鹿児島市
- 6) 井上貴史、神廣創太、野中成晃、佐野隆史、片倉賢、奥祐三郎(2005): 糞便由来DNAによる糞主動物の鑑別と多包条虫の検出—糞便表面洗浄液を用いて—. 第52回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 2005年10月11日, 江別市
- 7) 池田貴子、野中成晃、片倉賢、奥祐三郎(2005): 都市部に生息するキツネ (*Vulpes vulpes shrencki*) の営巣地選択について. 第52回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会 2005年10月11日, 江別市
- 8) Nonaka, N., Oku, Y. and Kamiya, M. (2005): *Echinococcus multilocularis* infection in companion animals in Japan and its related aspects for health risk management. The 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 16-20 October 2005, Christchurch New Zealand

F. 研究協力者

奥祐三郎、野中成晃、松本淳、金井祐太、井上貴史、池田貴子、佐野隆史、神廣創太(北海道大学大学院獣医学研究科寄生虫学教室)
八木欣平(北海道立衛生研究所)
福井大祐(旭山動物園)

様式 3

分担研究報告書

住血原虫症の免疫学

分担研究 研究者 五十嵐郁男 帯広畜産大学 教授

研究要旨

動物並びに人獣共通感染症としても重要なバベシア症の関して、バベシア原虫の赤血球への侵入機構や、増殖機構、診断法の開発について検討を行った。その結果、バベシア原虫の赤血球の侵入にはシアル酸が重要である事が明らかとなった。また、新たな診断用抗原の同定、血清学のおよび遺伝子診断法の開発が行われた。

A. 研究目的

住血原虫のバベシアはダニの媒介により動物に感染し、発熱、貧血、黄疸などの症状を引き起こし、世界的に甚大な経済的な被害を与えている。また、人に感染するバベシア原虫も報告されている。しかし、バベシア原虫の分子レベルでの赤血球への侵入、赤血球内での原虫の増殖のメカニズムなど不明な点が多く、また有効な治療・予防法や診断法の開発も遅れている。そこで、本研究ではバベシア原虫の侵入機構や新たな診断法の開発を目的とした。

B. 研究方法

(1) バベシア原虫の侵入機構,増殖機構の解析

ウマ赤血球をノイラミにダーゼを加えて37度で3時間処理し、PBSで洗浄後、ウマバベシア原虫 *B. caballi* と *B. equi* の *in vitro* 培養に用いた。また、培養系にシアル酸を添加し、バベシア原虫の増殖に対する影響を検討した。ウシバベシア原虫の培養に血清を添加しない方法を開発し、薬剤の効果を検討した。

(2) バベシア症に対する診断法の検討

ウマとイヌバベシアの DNA を免疫血清を用いてイムノスクリーニングを行い、診断に適した抗原の検索、組み換え抗原の作製および ELISA 法の検討を行った。

また、遺伝子診断として、PCR、LAMP法について検討した。

C. 研究結果

(1) バベシア原虫の侵入機構,増殖機構の解析

ウマの赤血球をノイラミにダーゼで処理すると、赤血球膜上 $\alpha 2-3$ 結合型のシアル酸残基が失われた。この赤血球をウマバベシア原虫 *B. caballi* の培養に用いると、赤血球寄生率の減少と赤血球外原虫数が増加し、原虫の赤血球侵入が阻止されていると推察された。また、 $\alpha 2-3$ 結合型のシアル酸を培養液に添加すると、その寄生率が抑制された。また、ハイブリドーマ細胞の培養に使用される GIT 培養液を用いると、血清の添加無しにウシバベシア原虫 *B. bovis* の培養が可能となった。更に、この培養系を用いることにより、原虫増殖抑制に必要な薬剤濃度の低下が認められた。

(2) バベシア症に対する診断法の検討

免疫血清あるいはモノクローナル抗体を用いたイムノスクリーニングにより、ウマバベシア、*B. equi* の Be158 抗原、*B. caballi* の 51kDa、免疫グロブリン結合抗原が新たに同定された。また、これらの抗原の遺伝子情報に基づいて、2種類のウマバベシア原虫 *B. caballi* と *B. equi* を同時に検出可能な PCR 法、一つの温度

設定で遺伝子の増幅が可能な LAMP 法も開発された。これらの診断法を用いた疫学的調査も行われた。

D. 考察

バベシア原虫の赤血球への侵入機構はこれまであまり解明されていなかったが、本研究によりウマの赤血球上のシアル酸が、バベシア原虫のレセプターとして機能している事が明らかとなった。今後、バベシア原虫側のリガンドを検索する事により、バベシアの赤血球への侵入機構の更に解明される事により、新たな薬剤や予防法の開発に寄与する期待される。

また、バベシアの診断法については新たな抗原遺伝子の同定により、これらの抗原を用いた ELISA 法が開発された。今後は、これらの方法を実用的な野外調査に応用することが期待される。また、新たに1度に2種類のバベシア原虫を診断可能な PCR や高額で精密な機材を必要としない LAMP 法などの遺伝子診断法は、今後益々必要と予想される正確で迅速な診断に役立つものと期待される。

E. 結論

バベシアの赤血球への侵入に関する新たな知見や、新規の血清学および遺伝子診断法の開発は、バベシア症の新たな治療や診断法の実用化に貢献するものと期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia. Vet. Parasitol. 127:29-32. 2005.
2. Cloning of a Novel *Babesia equi* Gene Encoding a 158-Kilodalton Protein Useful for Serological Diagnosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12:334-338. 2005.
3. Development of a single-round

and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. Vet. Parasitol. 129:43-49. 2005.

4. *Babesia caballi* and *Babesia equi*: Implications of host sialic acids in erythrocyte infection. Exp. Parasitol. 110: 406-411. 2005.
5. Host serum modifies the drug susceptibility of *Babesia bovis* in vitro. Parasitology. 30:489-492. 2005.
6. Molecular cloning and characterization of a putative binding protein of *Babesia caballi*. Am J Trop Med Hyg. 73:1135-1138. 2005.
7. Molecular characterization of a putative protein disulfide isomerase from *Babesia caballi*. Parasitology. 131:775-782. 2005.

2. 学会発表

1. 硫酸化多糖によるウシバベシア原虫の赤血球深憂阻害効果について。横山直明ほか6名、第74回日本寄生虫学会、2005年4月8日、米子
2. *Babesia equi* および *B. caballi* の赤血球侵入におけるカルシウムイオンの関与。大久保和洋ほか5名、第140回日本獣医学会、平成17年9月29日、鹿児島
3. マウスバベシア原虫共通抗原の探索、高島規之ほか4名、第140回日本獣医学会、平成17年9月29日、鹿児島
4. 難治性原虫感染症に対するオリゴマンノース糖鎖リポソームワクチンの評価、横山直明ほか7名、第140回日本獣医学会、平成17年9

月29日、鹿児島

5. 馬ピロプラズマ病抗体測定 ELISA の評価、第140回日本獣医学会、平成17年9月29日、鹿児島。
6. An immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of both *B. caballi* and *B. equi*. X. Huang, et al. The 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 16-20 October, 2005, Christchurch, New Zealand.

Naegleria fowleri 及びその近縁種 *N. lovaniensis* におけるタンパク組成の比較

分担研究者 遠藤卓郎 国立感染症研究所・寄生動物部
協力研究者 小村麻子、 泉山信司、 八木田健司、
下河原理江子

概要

原発性アメーバ性髄膜脳炎の原因アメーバである *Naegleria fowleri* の病原性解析の一環として、同一形態種で非病原性の *N. lovaniensis* との比較を通し、各生活環のステージにおけるタンパクの発現、及びその調整について病原性発現との関連で解析を試みた。これまでに、N 末端及び中間アミノ酸配列の解析に向けて各種の解析方法を検討した。これまでに得られた両種に共通の蛋白、それぞれの種に固有の蛋白スポットを同定し、同定された物質名、得られたアミノ酸配列等をデータベースとして情報公開している。

A. 研究の目的

自由生活性の小型アメーバである *Naegleria* 属アメーバは淡水環境中に広く棲息するが、*N. fowleri* など数種のアメーバは 26°C 以上の温水環境に好んで棲息する。本属原虫の生活環にはアメーバ期、鞭毛期と嚢子期の 3 つのステージが知られている。本属 *N. fowleri* は強い病原性を示す。ヒトへの感染は鼻腔粘膜に裸出する嗅神経末端から侵入して経神経的に脳へ達することが知られている。神経系に対する親和性や組織侵入性に係る因子の発現機構は不明である。また、病原性発現と生活史上の発育ステージとの関係も明らかとなっていない。本研究ではこれらの各ステージにおけるタンパクの発現、及びその調整について病原性発現との関連で解析を試みた。

具体的には *N. fowleri* と生態学的にも形態学的にも分類が不可能とされ、わずかに数種のアイズアムの違いが認められているに過ぎない非病原種の *N. lovaniensis* とのタンパク発現を 2D-PAGE により比較し、両者のタンパクレベルでの相同性について網羅的に把握し、さらには *N. fowleri* に特徴的なタンパク質の

クリーニングを行った。また、この 2D-PAGE 解析により得たタンパクスポット情報を参考に *N. fowleri* のタンパクスポットについて N 末端及び中間アミノ酸配列解析や LC-MS/MS 解析を行った。さらに、2D-PAGE データベースの構築を行い、様々な解析から得たスポット情報を統合した。

また、現在のところ *Naegleria* 属アメーバの核酸情報は多くなく、プロテオーム解析のみによるタンパク質の同定には限界がある。そこで部分アミノ酸配列情報を得たタンパク質で未知のものについては、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する試みも開始した。

B. 研究方法

2-1. アメーバ及び培養条件

N. fowleri 5 株、*N. lovaniensis* 2 株を 2D-PAGE 解析に用いた(表 1)。SCGYEM 培地を用いて 30°C で無菌培養し、それぞれ約 10⁷ 個の虫体を回収し PBS で洗浄した後、使用時まで -80°C で保存した。

アメーバ	株	アメーバ	株
<i>N. fowleri</i>	Nf66	<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45D
	KUL		TS
	Kurume		
	Lee		
	76/14/S3		

表 1. 供試検体

2-2. 2D-PAGE 条件、スポット検出方法

上記で得られた虫体を凍結融解し、TCA (10%) 沈殿により得られたタンパク画分をサンプルバッファー (9M 尿素, 2% Triton X-100, 1% DTT, 0.5% Pharmalyte pH3-10, BPB) に溶解してサンプルとした。サンプル溶液中のタンパク量は 2-D Quant Kit (GE ヘルスケア バイオサイエンス社) を用いて測定し、1 回の泳動当たり 100 μ g 相当をサンプルとして用いた。1 次元目の等電点電気泳動は IPG phor (GE ヘルスケア バイオサイエンス社製) を用い、画像解析には 18 cm イモビリンストリップで 35,000V h r、ウェスタンブロット解析には 13 cm のイモビリンストリップで 18,000V h r 泳動を行った (18、13 cm イモビリンストリップ: GE ヘルスケア バイオサイエンス社)。2 次元目の SDS-PAGE はバイオクラフト社製縦型泳動装置を用い、18 cm ストリップでは 24 \times 20 \times 0.1cm、12.5%gel で 12.5mA/gel、16 時間、13 cm ストリップでは 17 \times 16 \times 0.1cm、12.5%gel で 8mA/gel、16 時間泳動した。

2D-PAGE 後、染色法による検出スポット数の変動について確認するため *N. fowleri*

Nf66 株及び KUL 株、*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株については銀染色と Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色の両方を各 5 枚ずつ行った。残りのサンプルについては CBB 染色のみ行い画像解析に用いた。

2-3. 画像解析

染色後のゲルはスキャナを用いて画像を取り込み、Image Master 2D Elite ver.3.0 (GE ヘルスケア バイオサイエンス社) で画像解析を行った。

染色法の違いによる検出スポット数の差を調べるため、銀染色及び CBB 染色時の平均スポット数を比較した。

また、*N. fowleri* 及び *N. lovaniensis* 2 種間の相同性について検討した。同種間の株差によるスポットのばらつきを平均化するため、*N. fowleri* 5 株、*N. lovaniensis* 2 株の 2D-PAGE スポットパターンから同一種ごとにアベレージゲルを作成し、両者を比較することで 2 種間の相同性について検討した (図 1 A)。また、*N. fowleri* 特徴的なタンパクスポットを検出する為、*N. lovaniensis* 2 株のタンパクスポットを足し合せたゲルを作成し、*N. fowleri* アベレージゲルと比較した (図 1

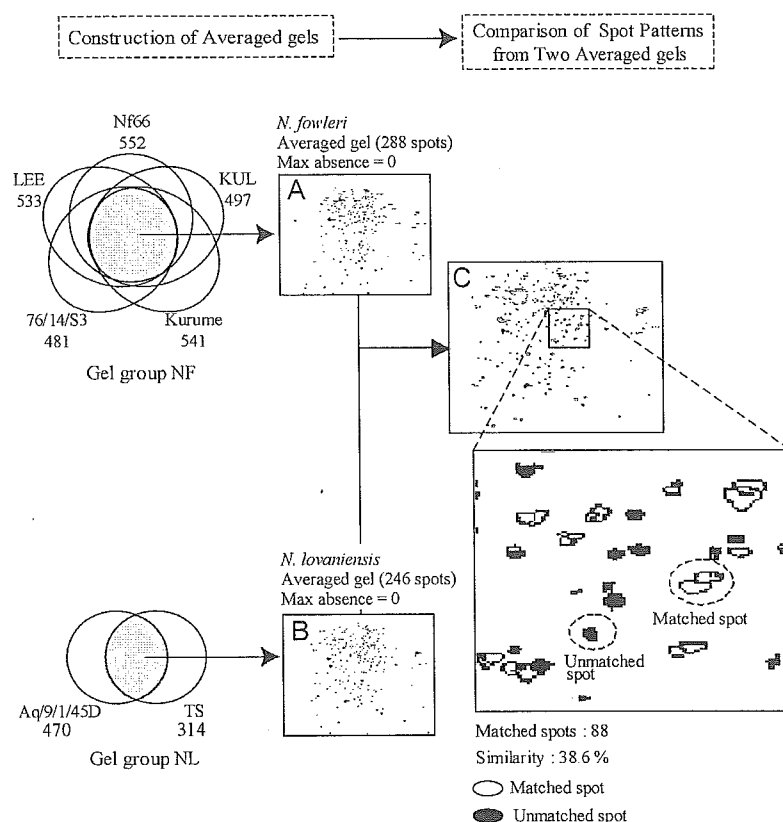


Fig. 1A. Diagrammatic representative of the analytical procedure for the identification of proteins common between *N. fowleri* and *N. lovaniensis*. A: *N. fowleri* Averaged gel represents proteins common among 5 strains of *N. fowleri*. B: *N. lovaniensis* Averaged gel represents proteins common between 2 strains of *N. lovaniensis*. C: Protein map with matched and unmatched spots.

B)。

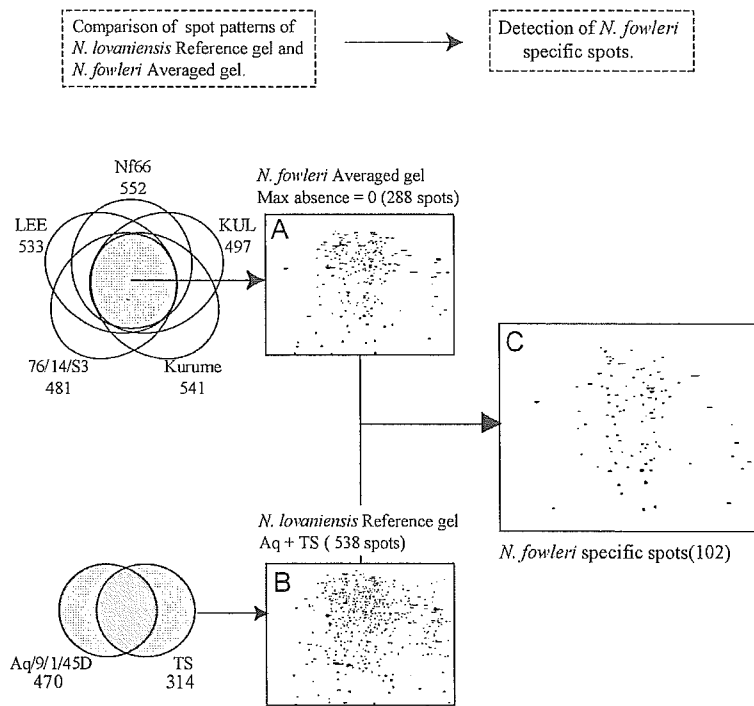


Fig. 1B. Diagrammatic representative of the analytical procedure for the identification of proteins unique to *N. fowleri*.
A: *N. fowleri* Averaged gel represents proteins common among 5 strains of *N. fowleri*. B: *N. lovaniensis* Reference gel represents the union of total proteins of Aq/9/145D and TS. C: Protein spots specific for *N. fowleri* were obtained as the unmatched spots of the *N. fowleri* Averaged gel to those of *N. lovaniensis*.

2-4. エレクトロブロットイング

2D-PAGE 後のゲルを PVDF 膜 (ProBlott (Applied Biosystems 社)) に以下の条件でブ

ロットイングし、得られたメンブレンを N 末端アミノ酸配列解析及びウェスタンブロット解析に用いた。

ブロットイングバッファー組成

Wet : 48mM Tris, pH9.2, 39 mM Glycine, 20% Methanol, 0.05% SDS

Semi-Dry : 25mM Tris, pH8.3, 192 mM Glycine, 20% Methanol, 0.05% SDS

ブロットイング装置及び条件 : Mini Trans-Blot (BioRad 社) 80 V 一定, 2 時間

Trans-Blot SD (BioRad 社) 15 V 一定, 40 分

2-5. N 末端アミノ酸配列解析

2D-PAGE 画像解析により得られたタンパクスポット情報を参考に、*N. fowleri* から *N. lovaniensis* との 2 種間共通あるいは非共通の主要なタンパクスポットを選び、N 末端アミノ酸配列解析を行った。上記のブロットイングで得た PVDF 膜を CBB 染色して目的のスポットを切出し、気相シーケンサー (Procise cLC494 (Applied Biosystems 社)) のエドマン反応槽に直接挿入してアミノ酸配列解析を行った。

酸配列解析

クリーブランド法によるペプチドマッピングに必要な 100 pmol 以上のタンパク量を確保するため 2D-PAGE を複数回行い、CBB 染色したゲルを乾燥して必要時まで保存した。複数枚のゲルから目的のスポットを切り出して細かく切断し、スタッキングゲルの高さを 5cm とした SDS-PAGE ゲル(20%) のウェルに入れた。各ウェルに 10%グリセロールを含むトリス-SDS 緩衝液 (125mM Tris-HCl(pH6.8), 0.1% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-ME) を加えゲル片を 1 時間膨潤した。5% グリセロールを含むトリス-SDS 緩衝液

2-6. クリーブランド法を用いた中間アミノ

(125mM Tris-HCl(pH6.8),0.1% SDS, 5% Glycerol) に *S. aureus* V8 プロテアーゼを溶解し、溶液をプロテアーゼが 1 サンプルにつき 2 μ g になるように各ウェルに重層して電気泳動を開始した。サンプルがスタッキングゲルの下端に濃縮されたところで 1 時間泳動を停止してタンパク質の部分酵素分解を行った。その後泳動を再開し、電気泳動終了後に PVDF 膜にブロッキングを行い、メンブレンを CBB 染色した。得られたペプチドのバンドを切り出し気相シーケンサー(Procise cLC494 (Applied Biosystems 社))のエドマン反応槽に直接挿入してアミノ酸配列解析を行った。

2-7. タンパク質のゲル内消化

2D-PAGE 後 CBB 染色したゲルから目的のスポットを切り出し、アセトニトリルで脱水した後、超純水で再膨潤した。この操作を 3 回繰り返してゲルスポットを洗浄した後、アセトニトリルで脱水し、濃縮遠心器で乾燥させた。10mMDTT を含む 100mM 重炭酸アンモニウム溶液をゲル片が覆われる程度加え、56°C で 1 時間インキュベートして還元した。溶液を取り除き、55mM ヨードアセトアミドを含む 100mM 重炭酸アンモニウム溶液を同様に加え、暗条件下で 45 分間反応させアルキル化を行った。ゲル片を 100mM 重炭酸アンモニウム溶液で 10 分間洗浄し、アセトニトリルを加えて脱水し、100mM 重炭酸アンモニウム溶液を再度加えて膨潤した。この操作を 2 回繰り返して、アセトニトリルを加えて脱水した後、濃縮遠心器で乾燥させた。5mM 塩化カルシウムを含む 50mM 重炭酸アンモニウム溶液にトリプシンを 25 ng/ μ l になるよう溶解し、溶液を各ゲル片が覆われる程度加え、氷中で 45 分膨潤した。膨潤後余分なトリプシン溶液を捨て、5mM 塩化カルシウムを含む 50mM 重炭酸アンモニウム溶液を 10 μ l 加えて 37°C で一晩インキュベートした。ゲル片を 20 mM 重炭酸アンモニウム 10 μ l で 1 回洗い溶液を新しいチューブに回収した後、5%ギ酸を含む 50%アセトニトリル溶液でペプチドを 3 回抽出した。回収液を濃縮してペプチドサンプルとした。

2-8. MALDI-TOF MS によるタンパクスポット解析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) による質量分析には Applied Biosystems 社製 Voyager DE-STR を用いた。上記 2-7. で濃縮したペプチド溶液を ZipTip C18(Millipore 社製)を用いて脱塩し、マトリックス溶液 (10mg/ml α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)/50%アセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸) で直接サンプルプレート上に溶出した。サンプルはリフレクターモードで測定し、得られたマススペクトルからピークリストを作成して MS-Fit によるデータベース検索を行った。

2-9. LC - MS/MSによるタンパクスポット解析と de novo sequencing

LC - MS/MS 解析には HPLC 部に MAGIC2002 (Michrom BioResources社)、質量分析部にはエレクトロスプレーイオン源/4重極イオントラップ型質量分析計 (ESI-IT MS) の LCQ-Deca XP (Thermo Eletron社) を用いた。上記2-7. で濃縮したペプチド溶液に 0.1%トリフルオロ酢酸溶液を加えて 20 μ l として、オートサンプラーに設置した。サンプルを HPLC で分離しながら、その溶出液を直接 ESI でイオン化し、IT 部でイオン化された成分についてデータディペンデントに MS/MS 測定を行った。得られた MS/MS データは Sequest プログラムを用いて NCBI NR データベースと照合した。MS/MS データの de novo sequencing には PEAKS Studio v2.4 (infocom 社)を用いた。

2-10. ウェスタンブロット解析

2D-PAGE 後ゲルを PVDF 膜にブロッキングした後、DyeChrome Western Blot Stain kits(Molecular Probes 社)を使用して、ウェスタンブロット解析を行った。同一メンブレン上で総タンパク質と特異的タンパク質を蛍光染色して検出し、総タンパクスポットパターン上で特異的タンパク質の位置を特定した。1 次抗体は回虫体壁斜紋筋精製アクチンを抗原とした家兎抗アクチン抗体と *N. fowleri* モノクローナル抗体(以下 Nf-5D12u, Indicia Biotechnology 社)、2 次抗体はアルカリフォスファターゼ標識抗体を用いた。

2-11. データベース構築

Naegleria の 2D-PAGE 解析及びアミノ酸