

配列解析の結果をデータベース化するために以下の処理を行った。

画面表示用の画像を作成する為、TIFF 形式で保存した 2D-PAGE ゲルのイメージに Illustrator (Adobe) を用いてサイズマーカーならびにスポット位置を表す標識(+印)等を書きこんだ後、TIFF 形式で保存した。作成した画像を最終的に JPEG 形式に変換して画面表示に使用した。この方法では Web ページ上での表示がブラウザに依存しないことからマーカーや標識等の位置が安定し、加えて再編集や出力解像度の変更が容易になるという利点がある。

クリックブルマップにはクライアントサイド・イメージマップの方法を用い、ゲルイメージ上にスポット情報へのハイパーリンクを設定して、スポットをクリックすると対応するスポット情報が表示されるようにした。

各タンパクスポットに関する情報は CSV 形式で作成し、Perl/Apache 上でカスタマイズした Listgen

(<http://yugen.main.jp/about/listgen/>) を用いて動的に作成した。動的に作成された html ファイルは Irvine

(<http://hp.vector.co.jp/authors/VA024591/>) を用いて一括保存した。さらにスポット情報のページには SWISS PROT や PubMed 等のデータベースへのリンクを設定した。

Web サーバーはセキュリティーを重視し、研究所で運営されているものを使用した。加えてアクセスログの取得を行い、異常なアクセスがないことを確認できるようにした。スポットファイルを生成する Web サーバーは個人用の端末を利用し、Active Perl ならびに Apache をインストールし、利用している。

html ファイルの作成にはテキストエディタ (MKEditor (<http://www.mk-square.com/>)) を利用した。実際の表示は Windows2000 上で Internet explorer V5.0

(Microsoft)、Netscape V7.1 (Netscape)、Opera V7 (Opera) を用いて確認した。

2-12. Degenerate PCR 法による部分遺伝子のクローニング

2D-PAGE 画像解析により *N. fowleri* に特徴的と認められたタンパクスポットの中から、N 末端及び中間アミノ酸配列情報を得たものをクローニングの対象とした。N 末端側を forward、中間配列を reverse として、20 残基前後のアミノ酸配列情報から、それぞれ 17~20mer 程度の degenerate primer を各 3 本程度設計した。*N. fowleri* Nf66 株のゲノム DNA を鋳型として、複数の primer の組合せを用いた nested PCR を行った。片側プライマーのみを用いた陰性対照との比較から、目的の DNA 断片を確認した。得られた DNA 断片を p Bluescript SK(+) phagemid (Stratagene 社) の EcoRV サイトに BKL キット (タカラバイオ社) を用いて導入した。形質転換後にユニバーサルプライマーを用いてコロニー PCR を行い、目的の断片が導入されたクローンから 5 個を選択して直接塩基配列決定を行った。得られた塩基配列と推定アミノ酸配列を用いて BLAST による相同性検索を行った。

C. 研究結果

1. 染色法の検討

N. fowleri Nf66 及び KUL 株、*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D 株の銀染色及び CBB 染色時の平均スポット数を表 2 に示した。CBB 染色ではスポット数は若干減少したものの、銀染色時におけるスポットごとの性質による染色むらや色抜けが起こらず、染色状況としては均一で再現性も銀染色より良好であった。そのため 2 種間におけるタンパクスポットパターンの比較検討には CBB 染色を用いることとした。

Amoeba		銀染色	銀染色
<i>N. fowleri</i>	Nf66 株	623	552
	KUL 株	630	497
<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45 株	652	470

表 2. 染色法の違いによる検出スポット数

また、CBB 染色時における *N. fowleri* 5 株及び *N. lovaniensis* 2 株の各スポット数を以下に示す

(表3)。

		株	アベレージゲル スポット数	Max absence=0
		<i>N. fowleri</i> Nf66	552	
<i>N. fowleri</i> の ゲルグループ		KUL	497	228
		LEE	533	
		Kurume	541	
		76/14/S3	481	
<i>N. lovaniensis</i> の ゲルグループ	<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45D	470	246
		TS	314	

表3.CBB染色時におけるスポット数およびアベレージゲルスポット数

2. 種内共通スポットの選出と、2 種間における相同性の検討

各種内に特徴的に共通するスポットを選出するため、*N. fowleri* で5株、*N. lovaniensis* で2株をそれぞれ1つのゲルグループとしてMax absence = 0 (種内のすべての株に出現するスポットのみ真のスポットとする)の条件でアベレージゲルを作成した(図1A参照)。この操作により各種内で株差によるスポットのばらつきを取除くことができ、その結果*N. fowleri* で228個、*N. lovaniensis* で246個の種内共通スポットが得られた(表3)。この両者を比較した結果、2種間共通スポットは88個で相同率は38.6%と予想に反し低かった。

3. *N. fowleri* 特徴的スポットの選出

2種のアベレージゲル同士による比較では、株差を排除して両種の特徴的な泳動像の相同性について検討することが可能であった。次に*N. fowleri* 特徴的と考えられるスポットを選出するために、比較の対象とする*N. lovaniensis* の株差を排除せず、2株で得られたタンパクスポットを全て足し合せたReference gel(スポット数528個)を作成し、*N. fowleri* のアベレージゲルとマッチングを行った(図1B参照)。その結果相同率は55%となり、両種間の比較では検出できなかった*N. lovaniensis* Aq/9/1/45株及びTS株のいずれかと共通するタンパクスポットを検

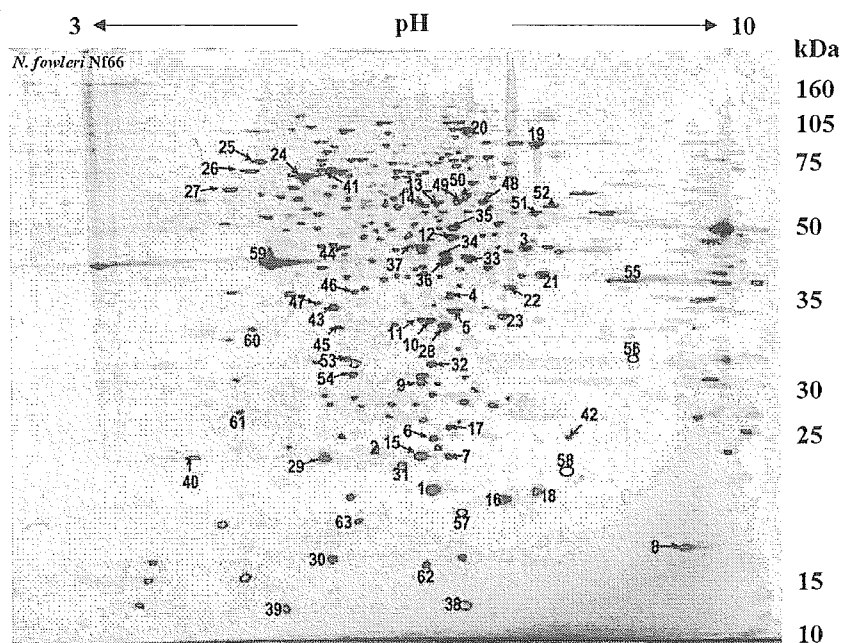


図2. *N. fowleri* 2D-PAGE スポットパターン解析結果

N. fowleri Nf66株の2D-PAGE画像上にスポット解析画像を重ねた。全てのマークされているタンパクスポットは*N. fowleri* 5株共通スポットであり、その内塗りつぶしたスポットが*N. fowleri* に特徴的なタンパクスポット(102個)を示す。アウトラインで示したものは*N. lovaniensis* 2株のいずれかに共通するスポット。数字の付いたスポットは何らかのスポット解析を行ったことを示す。

出すことができた。これらを *N. fowleri* 5株共通スポットから差引くことにより、102

4. タンパクスポット解析

これまでに *N. fowleri* Nf66株の主要な63個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、LC-MS/MS解析等を行い、これらの内14個については同定できた。各スポットの解析状況を図2及び別表1に示した。解析で得た15残基以上のアミノ酸配列をUniProtデータベースに登録した(P83898, P83723, P83602, P83737, P83889, P83890, P83598, P83899, P83601, P83724, P83725, P83726, P83727, P83728, P83729, P83730, P83600)。これらの配列を別表2に示した。

N末端アミノ酸配列解析は *N. fowleri* Nf66株の59個のスポットについて行っており、そのうち21個はN末端のブロックが疑われた。5個は泳動時の分離が不十分であった。残りの33個について20残基前後のN末端アミノ酸配列が得られた。得られたN末端アミノ酸配列についてはFASTAを用いて既存のタンパク質とのホモロジー検索を行った。検索の結果 Expectation value が0.1以下の相同性を有するスポットは11個で、その内10個はこれまでの画像解析により2種間共通とされたスポットであった。一方N末端アミノ酸配列を得た13個の *N. fowleri* 特徴的なスポットの内、既存のタンパク質と相同性を認めたのは1個のみで、ほとんどが未知の配列であった。

N末端ブロックあるいはN末端アミノ酸配列から同定が出来なかったスポットについて、V8プロテアーゼを用いたクリーブランド法を応用してデブロッッキングを試みた結果、10個のスポットの中間配列情報が得られ、その内3個のスポットについては相同性検索により同定できた。クリーブランド法によるペプチドマッピングはHPLCによるペプチド分取に比べ感度が低く、少なくとも100 pmol以上の多量のサンプルを必要とする点で不利である。しかし一度に多くのサンプル(1日当たり10個程度)を扱える点では有利であり、またペプチドのパターンをPVDF膜に転写しておくことで、ペプチドサンプルの保存も容易である。*Naegleria* 属アメーバは比較的培養が容易で、十分なタンパク量を確保しやすい

個の *N. fowleri* 種特徴的スポットの情報が得られた。解析の結果を図2に示す。

ことから、中間アミノ酸配列解析を効率的に行う上でクリーブランド法は有効であると考えられる。

質量分析による *N. fowleri* のタンパク質解析では、MALDI-TOF MSで20個、LC-MS/MS測定では5個のスポットを解析した。MALDI-TOF MSを用いたペプチドマスマフィンガープリンティング法(PMF法)による解析ではタンパクの同定は出来なかった。LC-MS/MS解析ではSequestサーチによりMP2CL5及びアクチンの同定が可能であった。このアクチンのMS/MSデータを用いてde novo sequencingを行ったところ、得られた配列はMascotサーチの結果とよく一致した。その他、未知のタンパクスポットについてもde novo sequencingを試み、3個のスポットからはそれぞれ5残基前後の中間アミノ酸配列情報を得たものの、そこからタンパクの同定には至らなかった。

プロテオーム解析においてPMF法はハイスループットな手法として主流であるが、同定作業が既存のデータベースに依存しているため、目的タンパクが登録されていない場合は同定が出来ない。ゲノムデータベース等が確立していない *Naegleria* 属アメーバでPMF法を行う場合、生物間で共通性の高いタンパク質については同定出来る可能性はあるが、*Naegleria* 属特有のタンパクに関しては現時点では限界があり、測定をしても未知の場合が非常に多かった。MS/MS解析についても同定作業がデータベースに依存しているのは従来と同様だが、MS/MSデータをとることでde novo sequencingを行える可能性が残る。シーケンシング用のソフトウェアも発達してきているので、未知のタンパクが多いサンプルについて質量分析を行う場合は、配列情報を得られる可能性が残るMS/MS解析を中心とした質量分析を進めるのが妥当だと考えられた。

5. ウェスタンブロット解析

N. fowleri Nf66株のウェスタンブロット解析では、抗アクチン抗体に反応したスポット5個、及びNf-5D12uに反応したスポット5

個が得られた。使用した抗アクチン抗体は回虫のみならず、原虫、哺乳類の骨格筋等にも広範囲の特異性を持つことが確認されており、今回分離したタンパク質中に複数のアクチン様タンパク質が存在することが示された。文献によると *N. gruberi* のアクチンの場合、分子量は 42 kDa、全タンパクに占める割合は 5~16%とされている (1)。今回抗アクチン抗体に対し、特に強い反応を示した 1 個のスポットについては約 42 kDa, pI 5.23 で、スポットボリューム比は約 7%であったことや上記の MS/MS 解析の結果と一致したことから、アクチンである可能性が高いと考えられる。一方、市販品である Nf-5D12u は *N. fowleri* の膜タンパク画分に反応し、糖鎖を認識するとされており、最も近縁の *N. lovaniensis* とも交叉反応しないものとされている。しかし今回の結果では、Nf-5D12u は 2 種間で共通と確認されたスポットとも反応した。この共通スポットについては、今後解析を進める予定である。

6. データベース構築

データベースを構築するにあたり、数百以上のタンパクスポットに対する情報ファイルを個別に記述することは大変な手間であり、変更も容易ではない。本研究では Perl/Apache 上でカスタマイズした Listgen (<http://yugen.main.jp/about/listgen/>) を用い、CSV 形式のデータから動的にスポットファイルを生成することとした。表示形式を指定するファイルをカスタマイズすることで全ファイルに対して一括して更新を適用することが可能であり、スポット数が多い場合に有効な手法であると考えられる。実際のカスタマイズには若干時間を要したが、動的に作成されたページのファイルをサーバー上に静的に配置することで、CGI を使用しない、より安全なサーバーの運用が可能となった。データの更新にも対応が容易で、半自動的にスポット情報ファイルを生成することが可能である。将来的には CSV 形式のデータを更新することでリアルタイムなページの更新を可能とすることも視野に入れており、カスタマイズ後のスクリプトの安全性が確認されればサーバーにアップロードすることも可能である。今後もデータの拡充をはかる予定である。

7. degenerate PCR 法による部分遺伝子のクローニング

2D-PAGE 解析により *N. fowleri* 特徴的であったスポットのうち、既に N 末端及び中間アミノ酸配列情報を得ている No.15 (24.1 kDa, pI 6.5) , No.35 (50.9 kDa, pI 6.7) (図 2 参照) の 2 個をクローニングの対象とした。それぞれ約 250 bp、約 400 bp の塩基配列を得、いずれの配列にも primer 設計に使用した元のアミノ酸配列情報を含むことを確認した。これらのスポットは部分アミノ酸配列によるタンパク質の推測が行えなかったが、今回得た推定アミノ酸配列を加えて相同性検索を行ったところ、No.15 は Thioredoxin peroxidase (22.3 kDa, 54/67 残基一致 (80%、Q6DV14))、No.35 は Glutamate dehydrogenase (55.0 kDa, 67/120 残基一致 (55%、Q54KB7)) と高い相同性を持つことが明らかとなった。2 つのタンパク質はすでに他の生物では isoenzyme の存在やその機能の違いについて報告がなされており (2,3)、生物に広く保存されていることが知られている。これらは *N. lovaniensis* にも存在すると予想され、実際 No.15 及び No.35 と近接した位置にそれぞれのスポットが存在することを確認した。しかし 2D-PAGE 画像解析では、わずかな差異で 2 種間において非共通スポットとして確認し、さらに No.15 に対応する *N. lovaniensis* のスポットの N 末端アミノ酸配列は *N. fowleri* とは異なっていた。2 種間におけるこれらのスポットの関連性の有無と機能の差異に興味を持たれる。

D. 考察ならびに結論

一般に *Naegleria* 属アメーバにおいては、最近 *N. gruberi* のゲノム解析が始まった段階であり、核酸配列、タンパク質の情報が多くはない状況であった。MALDI-TOF などによるプロテオーム解析はこれらのデータベースに依存しているため、*N. fowleri* の解析には不利であり、そのためスポット解析の方法としては自動エドマン分解によるアミノ酸配列解析を中心に行った。しかし将来的にはデータベースの充実も予想され、MS データからのタンパク質の同定も可能になることを想定し、アミノ酸配列の de novo sequencing が可能な MS/MS 解析を行い、データの蓄積に努めている。

また、これらのアミノ酸配列情報を利用し、遺伝子側からのタンパク質同定への試みも継続していく予定であり、*N. fowleri* 2D-PAGE データベースの拡充を図っていきたいと考える。

参考文献

- (1). Sussman DJ. et al., *J Biol Chem.*, 1984;259(11),pp.7349-7354
- (2). Fang J. et al., *J. biochem. chem.*,2005;280,pp.25284-25290
- (3). Burki F. et al., *Nat Genet.*, 2004;36(10),pp.1061-1063.

F. 研究発表

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

「Comparative study of protein profiles on pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species by 2D-PAGE」[in preparation]

赤痢アメーバの分子疫学に関する研究

分担研究者 野崎 智義 群馬大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 赤痢アメーバ症は熱帯・亜熱帯の開発途上国のみならず、我が国においても、主に男性同性愛者と知的障害者施設において深刻な医学的・社会的問題を引き起こしている。本研究では赤痢アメーバ症の分子疫学研究に応用されるべき、多様性の高い遺伝子群として、低分子量GTP結合タンパク質 Rab を網羅的に同定し、系統樹解析を行うとともに、適切なアノテーションを行った。これらにより多様性をもつ遺伝子群の配列を用いた分子疫学が可能となった。

A. 研究目的

赤痢アメーバ症は熱帯・亜熱帯の開発途上国のみならず、我が国においても、主に男性同性愛者と知的障害者施設において深刻な医学的・社会的問題を引き起こしている。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説明されているが、それぞれの貢献度は不明である。2005 年の全ゲノムの解読により赤痢アメーバの標準株における遺伝子情報が明らかになり、分子疫学のベースが作られた。しかしながら、注釈付け（アノテーション）は大きく遅れており、その整備が今後の赤痢アメーバ症分子疫学及びその生物学の解明に不可欠である。そこで我々は、我々が専門としてきた小胞輸送の分子スイッチである Rab の多様性の解明を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子の獲得

赤痢アメーバの既知の 20 個余りの Rab タンパク質及び酵母・人から得られた全 Rab タンパク質を用いて TIGR の *Entamoeba histolytica* genome database から相同性を示す遺伝子を

スクリーニングした。更に得られた配列は NCBI の non-redundant database に対して blastp 検索を行うとともに、GTP 結合コンセンサスなどの保存を確認した。

4. 系統樹解析

得られた 91 の赤痢アメーバ Rab タンパク質に関して、酵母・人の Rab とともにタンパクのアラインメントを行い、ギャップ及びアラインメントの悪い部分を除いた後、ClustalW により系統樹を作成した。

（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 Rab タンパク質の遺伝的多様性

赤痢アメーバは他の真核生物全般に比べ 91 もの驚異的な数の Rab タンパク質を持っていた。91 個の Rab のうち人及び酵母と有意な相同性を示したのはわずかに 22 に過ぎず、4分の3は 40%以下の同一性を示し、比較的赤痢アメーバに特異的な Rab であると想像された。

2. 系統解析から明らかにされた赤痢アメーバ Rab の特徴

91のRabのうち約3分の1がサブファミリーを形成していた。その中には他種生物でリソソームの輸送に関与するRab7が含まれ、他種と異なり、少なくとも9種類のアイソタイプとして存在した。その他にもRab11, RabCなど計15種のRabがアイソタイプを有した。

3. 赤痢アメーバRabの遺伝子・タンパク質配列上の特徴

約70%のRabが一つ又は複数個のイントロンを有していた。25個のRabはRabとして非定型的なCXXX, XCXX, XXCX, XXXC, XXXX末端を有していた。

4. 赤痢アメーバRabのアノテーション

系統解析とタンパクレベルでの同一性に基づき、91のRab遺伝子を分類し、命名した。他種生物と有意に同一性を示す者に関しては数字で、Rab1, Rab2, Rab5, Rab7, Rab8, Rab11, Rab21のように命名した。アイソタイプに関してはRab1A, Rab1Bのように数字の次にアルファベットで示した。赤痢アメーバに独自のRabのうちアイソタイプをもつものに関してはアルファベットでRabC, D, E.のようにRabPまで命名した。アイソタイプに関しては数字を付加した(例えばRabC1)。孤立した赤痢アメーバ独自のRabはRabX1のように”RabX”に数字を順番に付加した。

D. 考察及び結論

以上の結果より赤痢アメーバの最も多様性の高い遺伝子群である低分子量GTP結合タンパク質Rabの全遺伝子配列が明らかにされるとともに、そのアノテーションが明確に付けられた。赤痢アメーバのRabの多様性、特にその数の多さと、赤痢アメーバ特異的Rabの存在などの生物学的意義に関しては、本研究目的の範囲外

なので考察しないが、赤痢アメーバ症の分子疫学研究において充分活用することの出来る遺伝子多様性のデータが得られたということが出来る。以上のデータをもとに来年度以降赤痢アメーバの多様性に関する研究を展開していきたい。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- i. Saito-Nakano, Y., Loftus, B. J., Hall, N., and Nozaki, T. (2005) The diversity of Rab small GTPases in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasitol.* 110, 244-252.
- ii. Mitra, B. N., Yasuda, T., Kobayashi, S., Saito-Nakano, Y., Nozaki, T. (2005) Differences in morphology of phagosomes and kinetics of acidification and degradation in phagosomes between the pathogenic *Entamoeba histolytica* and the non-pathogenic *Entamoeba dispar*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 62, 84-99.

2. 学会発表

- i. 中野由美子、津久井久美子、Biswas N. Mitra、岡田麻美、ぬで島麻衣、徳丸文恵、繁田泰男、野崎智義 (2005) 赤痢アメーバのリソソーム形成における EhRab7 アイソタイプの解析 (2005) 第74回日本寄生虫学会大会 April 8-9, 2005, 米子, 鳥取.
- ii. Saito-Nakano, Y., Okada, M., Mitra, B. N., Nakada-Tsukui, K., Kobayashi, S., and Nozaki, T. (2005) Role of Rab7 isoforms on virulence in *Entamoeba histolytica*. 第58回日本細胞生物学会大会 2005年6月15-17日埼玉.
- iii. 中野由美子、岡田麻美、野崎智義 (2005) ゲノム情報から観

る赤痢アメーバの膜輸送 第 13
回分子寄生虫学ワークショップ
2005 年 8 月 1-4 日 トムラ

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず。

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

- 1) 都市域におけるアカイエカの越冬生態に関する調査研究
- 2) デング熱媒介蚊の寄生原虫 *Ascogregarina* spp. に関する基礎的研究

分担研究者	小林 睦生	国立感染症研究所昆虫医科学部
研究協力者	二瓶 直子	国立感染症研究所昆虫医科学部
	Roychoudhury, S.	国立感染症研究所昆虫医科学部
	伊澤 晴彦	国立感染症研究所昆虫医科学部
	佐々木 年則	国立感染症研究所昆虫医科学部
	澤邊 京子	国立感染症研究所昆虫医科学部
	津田良夫	国立感染症研究所昆虫医科学部

研究要旨

1) アカイエカの越冬生態に関しては、一部、高層住宅の地下等で越冬蚊を少数目撃したとの情報があるものの、都市部の住宅地周辺での越冬生態は全く調査されていない。2005年厳冬期（2月上旬）に埼玉県 K 市の暗渠（用水路）で越冬蚊の調査をおこなった。東西に走る2ヶ所の用水路に潜り調査をしたところ、入り口から 10m ほどからアカイエカが壁面、天井に静止しているのが観察された。また、入り口から 10-20m の範囲に越冬蚊が集中して観察され、それ以上奥へ進むとほとんど観察されなくなった。用水路 A では 163 匹、B では 51 匹のアカイエカが採集され、アセチルコリンエステラーゼの部分配列を利用した分子分類によって全ての捕集蚊はアカイエカと同定された。

2) デング熱媒介蚊（ネッタイシマカとヒトスジシマカ）の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. に関して生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノム DNA を高純度で得る方法を確立し、分子分類が可能となった。また、オオクロヤブカの原虫は上記2種の原虫とは異なる性質のあることが明らかとなり、生物的防除に利用できる可能性が示唆された。

A : 研究目的

1) アカイエカの越冬生態に関しては、1970年代に真喜屋らが防空壕内での越冬蚊の発生動態を詳細に検討している。しかし、一部、高層住宅の地下等で越冬蚊を少数目撃したとの情報があるものの、都市部の住宅地周辺での越冬生態は全く調査されていない。アカイエカは、現在米国で流行しているウエストナイル熱の重要な媒介蚊である。

最近の情報では、米国におけるウエストナイルウイルス(WNV)の連続した流行には、越冬するアカイエカ体内でウイルスが存在することが関係していると言われており、その意味からアカイエカの我が国での越冬生態を明らかにすることは重要である。

3) ネッタイシマカおよびヒトスジシマカの寄生原虫である *Ascogregarina* spp. は宿

主特異性が高く、感染後期にマルピギー管内に形成されるガメトシストには多数のオーシストが形成され、最終的に水系に排泄される。このような生活環を利用し、この原虫に外来遺伝子を導入してヤブカ幼虫に感染させ、生理機能を攪乱させる方法等によって蚊を防除することを最終目的に基礎的研究を進めている。また、直接別種の原虫を防除対象のヤブカに感染させることによって防除する生物学的防除法も詳細に評価する必要がある。この原虫のオーシストは1匹の感染蚊から多数回収することが可能で、生物的防除、遺伝子導入法確立のために実験に利用しやすい特徴があり、新しい発想による防除法の確立が期待される。

B：研究方法

1) アカイエカの越冬場所を探すために、都市部に存在する暗渠（用水路）で調査を行った。吸虫管、ライト、記録用カメラ等を持参し、入り口からの距離を測りつつ奥へ進んで壁面に静止しているアカイエカ成虫数をカウントした。また、一部は吸虫管で採集し、実験室へ持ち帰って種の同定、ウイルスの分離を行った。我が国のアカイエカ種群には、アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカ（沖縄、八重山）の3種があり、雌での外部形態での分類は困難である。そこでアセチルコリンエステラーゼの部分配列を利用して、新たなプライマーを設計し、分子分類を行った。

また、日本脳炎およびウエストナイル熱ウイルスの検出は、細胞培養法、RT-PCR法を併用して行った（他研究事業）。

3) 東北および北海道で捕集されたヤマトヤブカ、関東地域で採集されたオオクロヤ

ブカの幼虫および蛹を解剖して *Ascogregarina* sp.原虫の栄養体、ガメトシストおよびオーシストを検出し、寄生状況を調査し、室内の継代を試みた。また、原虫のオーシストより DNA を抽出し、SSU rDNA の塩基配列を4種類の原虫と比較し、系統樹を作成した。

C：研究結果

1) 2005年厳冬期（2月上旬）に埼玉県K市の暗渠（用水路）で越冬蚊の調査をおこなった。予備調査として、調査可能な暗渠に潜り、越冬蚊を調査したが、南北に走る暗渠には全く越冬蚊が認められなかった。東西に走る2ヶ所の暗渠において、越冬アカイエカが静止しているのが認められたことから、2ヶ所の暗渠を中心に調査を行った。入り口から10mほどから暗渠内はほぼ暗黒の状態、ライトがないと歩けない状態であった。また、入り口付近には静止しているアカイエカが全く認められなかった。入り口から10mほどからアカイエカが壁面、天井に静止しているのが観察された。また、入り口から10-20mの範囲に越冬蚊が集中して観察され、それ以上奥へ進むとほとんど観察されなくなった。用水路Aでは163匹、Bでは51匹のアカイエカが採集された。暗渠内の環境としては、外気温が温度8.4℃であったが、内部は7.1-7.8℃と若干低い温度であった。アセチルコリンエステラーゼの部分配列を利用した分子分類によって全ての捕集蚊はアカイエカと同定された。

2) デング熱媒介蚊（ネッタイシマカとヒトスジシマカ）の寄生原虫である *Ascogregarina* spp.に関して生活環、生物

学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノム DNA を高純度で得る方法を確立した。その結果、少なくとも4種の原虫を分子分類することが可能となった。また、系統樹解析を行ったところ、ネッタイシマカとヒトスジシマカの原虫は非常に近縁で、塩基配列に関して相同性が高かったが、ヤマトヤブカおよびオオクロヤブカの原虫は上記の2種とは若干離れることが明らかとなった(図)。オオクロヤブカの原虫である *Ascogregarina armigerei* は分子的にも形態的にも相当異なることがあきらかとなった。この原虫は栄養体が中腸上皮細胞に侵入してから動き回る傾向があり、最終的に栄養体同士が10-20匹集まっている像が観察されている。この行動は蚊の幼虫の中腸の上皮細胞に相当ダメージを与えることが想像された。実際、オオクロヤブカの1令幼虫に *A. armigerei* を実験感染させた場合、幼虫死亡率が高いことが観察された。これら原虫の性質から、他種の蚊幼虫の生物的防除に利用する可能性が示唆された。

D:考察

1) アカイエカの越冬生態に関しては、1970年代に真喜屋らが愛知県の防空壕内での越冬蚊の発生動態を詳細に検討している。しかし、その後、アカイエカの越冬生態に関してはほとんど調査がなされておらず、都市部において、どのような場所でアカイエカが越冬しているかほとんど分かっていない。今回、埼玉県の都市部において、アカイエカが越冬している暗渠が複数見つかри、調査を行った。この都市は、年間アカイエカが CDC ライトトラップで約1,000匹捕

集される環境で、アカイエカの個体群密度は高い。暗渠は東西に約200-300mのびており、南北に走っている暗渠と比べると冬期に北風が吹き込むことが少ない環境である。また、越冬蚊が見つかった暗渠内は湿度が高い傾向が認められた。越冬蚊がより多数みつかる環境が明らかとなった場合、冬期に薬剤によって防除することによって翌年の個体密度を抑える効果があると考えられる。しかし、どのような場所を好んで越冬しているのかは、少数の暗渠しか調査していないことから結果を出すことができない。WNVの越冬の問題もあり、今後より広範な調査が必要と考えられた。

2) デング熱媒介蚊(ネッタイシマカとヒトスジシマカ)の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. は宿主特異性が高く、ヤブカ幼虫に大量に感染させることによって、容易に多数のオーシストを回収することが出来る。この生物学的特徴を利用して、外来遺伝子の運びや(vector)として利用し、新しい防除法の確立を最終目標として基礎的研究を行った。原虫の生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノム DNA を高純度で得る方法を確立した。その結果、4種の原虫を分子分類することが可能となった。また、系統樹解析を行ったところ、ネッタイシマカとヒトスジシマカの原虫は近縁で、塩基配列に関して相同性が高かったが、ヤマトヤブカおよびオオクロヤブカの原虫は上記2種とは若干離れることが明らかとなった。特に、オオクロヤブカの原虫である *Ascogregarina armigerei* は分子的にも形態的にも他の種類と異なる

ことが明らかとなった。この原虫は中腸上皮細胞に侵入してから動き回り、最終的に栄養体同士が 10-20 匹集まる性質を有している。この行動は蚊の幼虫の中腸の上皮細胞に相当ダメージを与えることが想像された。実際、オオクロヤブカの 1 令幼虫に *A. armigerei* を実験感染させた場合、他の原虫と宿主との感染例と比べ幼虫死亡率が高いことが観察された。これら原虫の性質を利用して、他種の蚊幼虫の生物的防除に利用する可能性が示唆された。

E:結論

1) 都市部におけるアカイエカの越冬生態を調査し、一部の暗渠で越冬しているアカイエカを採集することができた。越冬蚊は翌年の個体群密度に非常に関係することから、より広範に越冬場所の調査を行い、冬期にアカイエカの防除を行うことも考える必要がある。WNV の越冬がアカイエカ体内で起こるとの情報もあり、今後のより詳細な調査が必要である。

2) デング熱媒介蚊（ネッタイシマカとヒトスジシマカ）の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. に関して生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノム DNA を高純度で得る方法を確立し、分子分類が可能となった。また、トウゴウヤブカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカから上記 2 種とは異なる原虫を分離することに成功し、生物的防除に利用する可能性を検討した。

F:健康危機管理情報
特筆なし。

G: 研究発表

1. 発表論文

1) Roychoudhury, S. and Kobayashi, M.: New finding on the developmental process of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina chulicis* in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control Assoc. (in press).

2) Sawabe, K., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Hayashi, T., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Tanabayashi, K., Hotta, A., Saito, T., Yamada, A. and Kobayashi, M.: Detection and Isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. J. Am. Trop. Med. Hygiene. (in press)

3) Sasaki, T., Poudel, S.K.S., Isawa, H., Hayashi, T., Seki, N., Tomita, T., Sawabe K. and Kobayashi, M.: First molecular evidence of *Bartonella quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), collected from Nepalese children. J. Med. Entomol., 43:110-112, 2006.

4) Seki, N., Sasaki, T., Sawabe, K., Sasaki, T., Matsuoka, M., Arakawa, Y., Marui, E. and Kobayashi, M.: Epidemiological studies on *Bartonella quintana* infections among homeless people in Tokyo, Japan. JJID., 59:31-35, 2006.

和文発表

1) 津田良夫, 比嘉由紀子, 伊澤晴彦, 星野啓太, 澤邊京子, 小林睦生: ウエストナイルウイルスの主要媒介蚊を決定する生態的特徴. 臨床とウイルス. 33 (1): 17-21, 2005.

2) 二瓶直子, 津田良夫, 小林睦生: 空中写真で衛生環境をどこまで読み取れるか. 生活と環境, 50(9): 48-53, 2005.

3) 小林睦生: 新興・再興感染症の流行と環境. 生活と環境, 50(11): 5, 2005.

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Sawabe, K., Isawa, I., Higa, Y., Kasai, K., Hoshino, T., Sasaki, Y., Tsuda, Y. & Kobayashi, M.: Host Feeding Patterns of several mosquito species in Japan.

2006 National Conference on West Nile Virus in the United States, San Francisco, February 23-24, 2006.

2. 国内学会

1) 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫, 比嘉由紀子, 高崎智彦, 小滝 徹, 小林睦生, 矢野和彦, 澤邊京子: 本邦生息蚊類が保有するウイルスの検出およびその性状解析.

第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月 26-27 日, 箱根町.

2) 澤邊京子, 伊澤晴彦, 比嘉由紀子, 葛西真治, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 小林睦生: 日本産ウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血嗜好性とアカイエカ種群の分子分類. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月 26-27 日, 箱根町.

3) 吉田政弘, 山下敏夫, 小林睦生: 都市

域における冬季の蚊幼虫・成虫調査. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月 26-27 日, 箱根町.

4) 津田良夫, 澤邊京子, 比嘉由紀子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 小林睦生, 桑山 勝: 広島県倉橋島の日本脳炎媒介蚊調査. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月 26-27 日, 箱根町.

5) 高井憲治, 小熊 譲, 栗原 毅, 小林睦生: *Anopheles sinensis* 成虫雌の脚白帯対節比の地理的変異. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

6) 津田良夫, 比嘉由紀子, 川田 均, 高木正洋, 小林睦生: アカイエカとチカイエカの地上における生態の比較調査法. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

7) 津田良夫, 比嘉由紀子, 星野啓太, 葛西真治, 林 利彦, 伊澤晴彦, 駒形 修, 佐々木年則, 澤邊京子, 富田隆史, 倉橋 弘, 二瓶直子, 小林睦生: 成田空港の周辺 3 地域における疾病媒介蚊相に関する調査結果. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

8) 二瓶直子, 津田良夫, 倉橋 弘, 比嘉由紀子, 駒形 修, 望月貫一郎, 小林睦生: 住宅地周辺のドライアイストラップ捕集蚊類等の発生状況と環境要因との関係. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

9) 渡辺 護, 小原真弓, 出村尚子, 松澤留美子, 小林睦生: 富山県における感染症媒介蚊の発生実態調査 (2003-04 年). 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

10) 吉田政弘, 山下敏夫, 小林睦生: 都市

域における蚊幼虫発生状況. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

11) 小林睦生, 葛西真治, 伊澤晴彦, 林 利彦, 二瓶直子, 津田良夫: 都市部におけるアカイエカ越冬個体の観察. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

12) 吉田政弘, 山下敏夫, 田所勝巳, 平良常弘, 小林睦生: 都市域における蚊類の越冬調査. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

13) 澤邊京子, 伊澤晴彦, 比嘉由紀子, 葛西真治, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 小林睦生: 日本に分布するウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血源動物種. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

14) 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫, 比嘉由紀子, 當間孝子, 佐藤英毅, 高崎智彦, 小林睦生, 澤邊京子: 本邦野外捕集蚊からのアルボウイルスの検出. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

15) Sudipta Roychoudhury, Isawa, H., Sasaki, T., Sawabe, K., Kobayashi, M.: Molecular variations in SSU rDNA sequences of some species of *Ascogregarina*, the non-pathogenic parasites of mosquitoes. The 57th Annual Meeting of the Japan Society of Medical Entomology and Zoology, June 1-3, 2005. Sapporo.

16) 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴彦, 澤邊京子, 小林睦生: 蚊体液中に含まれるシアル酸特異的レクチンの質量分析による解

析. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

17) 佐々木年則, 佐々木次雄, 久保田真由美, 川端寛樹, パウデル・カンタ・シャルマシュリー, 星野啓太, 比嘉由紀子, 伊澤晴彦, 富田隆史, 澤邊京子, 荒川宜親, 小林睦生:

再興感染症としての塹壕熱および回帰熱に関する疫学調査. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

18) 葛西真治, 駒形 修, 正野俊夫, 富田隆史, 倉橋 弘, 澤邊京子, 比嘉由紀子, 津田良夫, 小林睦生, 元木 貢, 高橋朋也, 谷川 力, 吉田政弘, 橋本知幸, 新庄五朗: ACE 遺伝子をマーカーとした日本産 *Culex pipiens complex* の簡易判別法. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

19) 葛西真治, 駒形 修, 正野俊夫, 富田隆史, 津田良夫, 小林睦生, 元木 貢, 高橋朋也, 谷川 力, 吉田政弘, 橋本知幸, 新庄五朗: 2003 年と 2004 年に行ったアカイエカ種群蚊の殺虫剤感受性調査. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

20) 小林睦生: 国内における疾病媒介昆虫類の生態と分布. シンポジウム—動物由来感染症ウイルス, 衛生微生物技術協議会第 26 回研究会, 17 年 7 月 7-8 日, 福井市.

21) 小林睦生: 病原体伝播者としてのハエ類. 「ハエの功罪」第 44 回日本衛生動物学会東日本支部例会, 17 年 7 月 22 日, 東京.

22) 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴彦, 澤邊京子, 小林睦生: オオクロヤブカ由来シアル酸特異的レクチンの質量分析による解析. 日本比較免疫学会第 17 回学術集会, 17

年 8 月 24-26 日，東京。

23) Kobayashi, M.: Mosquito surveillance in urban areas of Japan and blood preference of vector mosquitoes in West Nile fever. Japan -Taiwan Symposium on Zoonotic Diseases, September 7-8, 2005.

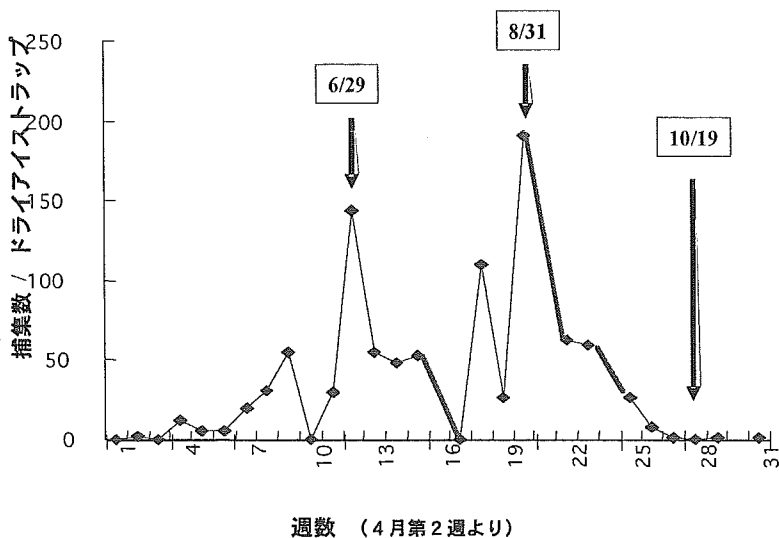
24) 津田良夫, 比嘉由紀子, 倉橋 弘, 林 利彦, 星野啓太, 駒形 修. 伊澤晴彦, 葛西真治, 佐々木年則, 富田隆史, 澤邊京子, 二瓶直子, 小林睦生: 都市域における疾病媒介蚊の発生状況調査. 日米医学協力寄生虫疾患専門部会・平成 17 年度国内会議, 18 年 2 月 18 日, 東京.

25) 二瓶直子, 津田良夫, 駒形 修, 比嘉由紀子, 倉橋 弘, 望月貫一郎, 小林睦生: 空中写真・都市 GIS による首都圏の感染症媒介蚊の監視. 日米医学協力寄生虫疾患専門部会・平成 17 年度国内会議, 18 年 2 月 18 日, 東京.

26) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 比嘉由紀子, 津田良夫, 伊藤美佳子, 高崎智彦, 小林睦生: 蚊からのウエストナイルおよび日本脳炎ウイルスの検出と吸血嗜好性から見た疾病媒介能の検討. 日米医学協力寄生虫疾患専門部会・平成 17 年度国内会議, 18 年 2 月 18 日, 東京.

2004年の埼玉県春日部市におけるアカイエカ捕集結果

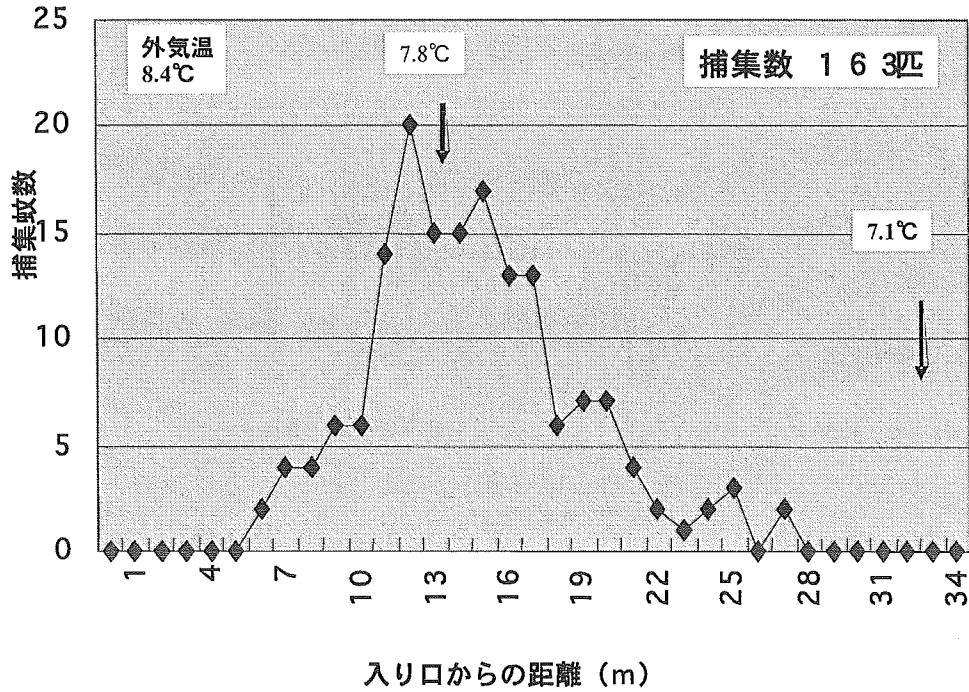
捕集総数 946匹



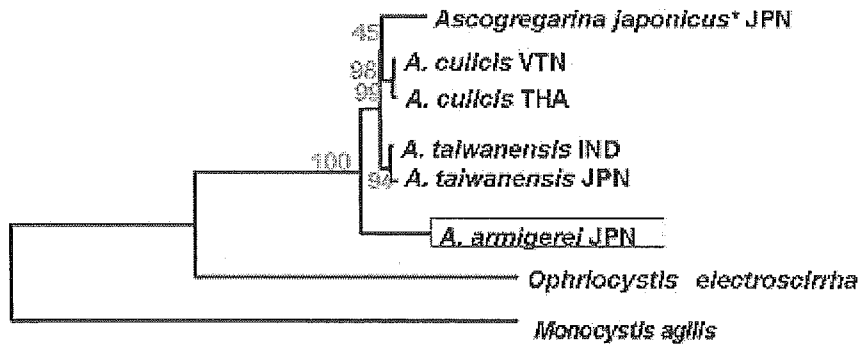
用水路Aの入り口



春日部市の用水路(A)における越冬アカイエカの調査



Apicomplexa NJ系統樹
(SSU-rDNA塩基配列より推定)



*ヤマトヤブカから分離された *Ascogregarina* 原虫(未記載)

JPN: 日本、VTN:ベトナム、THA:タイ、IND:インド

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Osada Y, Kumagai T, Hato M, Suzuki T, El- Malky M, Asahi H, Kanazawa T & <u>Ohta N.</u>	Establishment of <i>Schistosoma japonicum</i> calpain-specific mouse T cell hybridoma and identification of a T cell epitope that stimulates IFN γ production.	Vaccine	23	2813-2819	2005
Sasaki Y, Yoshimoto T, Maruyama H, Tegoshi T, <u>Ohta N.</u> , Arizono N & Nakanishi K.	IL-18 with IL-2 protects against <i>Strongyloides venezuelensis</i> infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity	J Exp Med	202	607-616	2005
Ohno N, Suzuki M, Matsumoto T, Ohashi T, Murakami S & <u>Ohta N.</u>	Strain differences of the immunostimulatory effect of CpG in OVA-sensitized mice.	Nagoya Med JI	47	111-122	2005

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inaok D K, Takashima E, Osanai A, Shimizu H, Nara T, Aoki T, Harada S. & <u>Kita K.</u>	Expression, purification, and crystallization of <i>Trypanosoma cruzi</i> dihydroorotate dehydrogenase complexed with orotate	Acta Crystallographica	F61	875-878	2005
Nakamura K, Sakamoto K. Kido Y, Fujimoto Y, Suzuki T, Suzuki M, Yabu Y, Ohta N, Tsuda A, Onuma M. & <u>Kita K.</u>	Mutational analysis of the <i>Trypanosoma</i> <i>vivax</i> alternative oxidase: the E(X) ₆ Y motif is conserved in both mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase and is indispensable for enzyme activity	Biochem. Biophys. Res. Commun.	334	593-600	2005
Mi-ichi F, Miyadera H, Kobayashi T, Takamiya S, Waki S, Iwata S. Shibata S. & <u>Kita K.</u>	Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: The inhibitory effect of licochalcone A on the <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> respiratory chain	Ann.New York Acad. Sci.	1056	46-54	2005
Yuasa K, Mi-ichi F, Kobayashi T, Yamanouchi M, Kotera J, <u>Kita K.</u> & Omori K.	PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase, from the human malaria parasite <i>Plasmodium</i> <i>falciparum</i> .	Biochem. J.	392	221-229	2005
Yabu Y, Suzuki T, Nihei C, Minagawa N, Hosokawa T, Nagai K, <u>Kita</u> <u>K.</u> & Ohta N.	Chemotherapeutic efficacy of ascofuranone in <i>Trypanosoma vivax</i> - infected mice without glycerol.	Parasitol. Int.	55	39-43	2006
Sariego I, Annoura T, Nara T, Hashimoto M, Tsubouchi A, Iizumi K, Makiuchi T, Murata E, <u>Kita</u> <u>K.</u> & Aoki T.	Genetic diversity and kinetic properties of <i>Trypanosoma cruzi</i> dihydroorotate dehydrogenase	Parasitol. Int.	55	11-16	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Rungruang, O. Kaneko, Y. Murakami, T. Tsuboi, H. Hamamoto, N. Akimitsu, K. Sekimizu, T. Kinoshita, <u>M. Torii</u>	Erythrocyte surface glycosylphosphatidyl inositol anchored receptor for the malaria parasite.	Mol. Biochem. Parasitol.	140	13-21	2005
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, <u>M. Torii</u>	Apical expression of three RhopH1/Clag proteins as components of the <i>Plasmodium falciparum</i> RhopH complex.	Mol. Biochem. Parasitol.	143	20-28	2005
T. Arakawa, A. Komesu, H. Otsuki, J. Sattabongkot, R. Udomsangpetch, Y. Matsumoto, N. Tsuji, Y. Wu, <u>M. Torii</u> , T. Tsuboi	Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of <i>Plasmodium falciparum</i> .	Infect. Immun.	73	7375-7380	2005

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
R. Ubalee, Tsukahara T, Kikuchi M, K Lum, M. Dzodzomenyo, Kaneko A, <u>Hirayama K.</u>	Association between a susceptible TNF-a promoter allele and malaria endemicity in Vanuatu.	Tropical Medicine and International Health	10	544-549	2005
M. Dzodzomenyo, Kaneko A, Kikuchi M, R. Ubalee, Osawa H, Tsukahara T, Tanihata T, H Perlmann, <u>Hirayama K & Kobayakawa T.</u>	IL4 polymorphisms and IgE levels on malaria-endemic islands in Vanuatu.	J. of Tokyo Women's Medical University	75	82-89	2005
Takeda M, Kikuchi M, Ubalee R, Na-Bangchang K, Ruangweeray R, Shibahara S, Imai S & <u>Hirayama K.</u>	Microsatellite Polymorphism in the Heme Oxygenase-1 Gene Promoter is Associated with Susceptibility to Cerebral Malaria in Myanmar.	Jpn. J. of infectious disease.	58	268-71	2005