

200804004A

厚生労働科学研究費補助金
社会保障国際協力推進研究事業
(国際医学協力研究事業)

**寄生虫疾患の病態解明及び
その予防・治療をめざした研究**

(H20-国医-指定-004)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平 山 謙 二

平成21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
社会保障国際協力推進研究事業
(国際医学協力研究事業)

寄生虫疾患の病態解明及び
その予防・治療をめざした研究

(H20-国医-指定-004)

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平山謙二

平成21(2009)年3月

目次

I. 総括研究報告	
寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究	平山謙二 …………… 1
II. 分担研究報告	
1. 寄生虫症感受性の宿主因子の検討に関する研究	平山謙二 …………… 8
2. 原虫症治療標的分子の機能解析	北 潔 …………… 11
3. マラリアの病態解明及びその治療をめざした研究	狩野繁之 …………… 15
4. ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立	坪井敬文 …………… 17
5. 赤痢アメーバの病原機構の解明	野崎智義 …………… 22
6. フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）	木村英作 …………… 26
7. フィラリア線虫と媒介節足動物の相互関係の解明	辻 尚利 …………… 30
8. 日本住血吸虫症の病態発現分子解析	太田伸生 …………… 32
9. マラリアおよび住血吸虫症の寄生適応機構の研究	金澤 保 …………… 35
10. リーシュマニア症対策疫学研究	我妻ゆき子 …………… 38
11. マラリア原虫の宿主細胞認識と侵入機序の解析	鳥居本美 …………… 40
12. 寄生虫感染と宿主応答	中西憲司 …………… 45
13. 遺伝子改変ハマダラカを作成し空飛ぶ注射器としての実用性を探る	松岡裕之 …………… 51
14. マラリアにおける宿主病原体相互関係の解析	久枝 一 …………… 52

15.	マラリア感染における T 細胞機能の解析	由井克之	54
16.	マラリア原虫の細胞侵入動態の解析	金子 修	58
17.	マラリア原虫に有効な新規阻害剤の探索	金 惠淑	60
18.	住血原虫症の伝播機構と治療薬に関する研究	片倉 賢	67
19.	<i>Tyranosoma cruzi</i> 感染宿主細胞におけるアポトーシス抑制と酸化ストレス応答について	嶋田淳子	69
20.	人獣共通寄生虫病の血清診断システムの開発と幼虫移行症の病態解明	丸山治彦	70
21.	住血原虫症の診断学	五十嵐郁男	75
22.	住血吸虫症の検査・診断・対策に関する研究	大前比呂思	79
23.	人獣共通寄生原虫・蠕虫症の寄生適応に関する分子生物学的解析	奈良武司	85
24.	我が国におけるマラリア媒介蚊の分布と分類に関する分子系統学的研究	小林睦生	87
25.	人獣共通幼虫症（脳囊虫症、エキノコックス症）の病態、診断、治療、予防に向けた研究	伊藤 亮	93
III.	研究成果の刊行に関する一覧表		100
IV.	研究成果の刊行物・別刷り		114

寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究

研究代表者 平山謙二 長崎大学熱帯医学研究所教授

研究要旨 アジア地域は多様な地理的環境と多様な民族により構成されているが、東南アジアを中心に熱帯地域が広がっている。これらの地域ではいまだに寄生虫感染症の患者が多数存在し、住民の健康に重大な影響を与えているばかりでなく、社会経済学的な影響も大きい。これら主要な寄生虫疾患の制圧を目指した新たな治療・予防法の開発を最終目標として、疾患別にグループを組み、各疾患の制圧を目指した基礎研究から応用研究を幅広く行い、真に地域の健康増進に資する研究を推進した。対象とした寄生虫疾患あるいは領域は以下のものである。(1) マラリア、(2) 住血吸虫症、(3) フィラリア症、(4) 住血原虫症(トリパノソーマ、リーシュマニア症など)、(5) 新興・再興感染症(腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコッカス症、人獣共通感染症など)、(6) 媒介昆虫領域である。上記の対象疾患の制圧に資する学術的な知見を得るために以下のようなアプローチで多様な研究を展開した。a) 保有宿主や媒介動物を含めた感染動態や伝播経路に関わる基礎研究、b) 病原体の寄生適応の分子メカニズム、c) ヒトの防御免疫および病態生理。

研究分担者名

北 潔 東京大学大学院・医学系研究科・教授
狩野繁之 国立国際医療センター研究所・部長
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
野崎智義 国立感染症研究所・部長
木村英作 愛知医科大学医学部・教授
辻 尚利 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・主任研究員
太田伸生 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
金澤 保 産業医科大学・教授
我妻ゆき子 筑波大学大学院人間総合科学研究科・教授
鳥居本美 愛媛大学大学院医学系研究科・教授
中西憲司 兵庫医科大学・教授
松岡裕之 自治医科大学・教授
久枝 一 九州大学医学研究院・准教授
由井克之 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
金子 修 長崎大学熱帯医学研究所・教授
金 恵淑 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授
片倉 賢 北海道大学大学院獣医学研究科・教授
嶋田淳子 群馬大学医学部・教授
丸山治彦 宮崎大学医学部・教授
五十嵐郁男 帯広畜産大学原虫病研究センター・教授
大前比呂思 国立感染症研究所・室長
奈良武司 順天堂大学大学院医学研究科・准教授
小林睦生 国立感染症研究所・部長
伊藤 亮 旭川医科大学・教授

A. 研究目的

アジアに拡がる寄生虫疾患に関する基礎研究を推進し、その制圧、予防、治療に資する革新的な知見を集積することを目的とする。

多くの寄生虫疾患は「見捨てられた病気」として分類され、途上国や研究環境の貧弱な地域で流行し、たくさんの命が奪われ、あるいは脅かされ続けている。この分野に光を当て、現地の研究者も含めて新しくより効率的な制圧法を開発することは日本や欧米先進国の役割である。本研究課題を推進することにより、アジア地域の研究者を巻き込んだ共同研究を活性化することが可能となる。また、寄生虫疾患という環境に密着した感染症に関する研究に日本やアジア地域の若手研究者が参加することで、新たな医学領域の後継者を育成することが可能となる。

B. 研究方法

マラリア、住血吸虫症、フィラリア症、住血原虫症、新興再興感染症、媒介昆虫の6つの疾患において、以下のような観点から分子レベルでの研究を行った。

A) 感染伝播メカニズム B) 寄生虫の宿主適応 C) ヒト防御免疫および病態生理

(倫理面への配慮)

本研究計画においてはアジアの流行地域での疫学調査の実施も含まれるので、WHOの基準に従った倫理基準に基づいて実施された。血液などの試料提供者には研究主旨を説明した上で自由意思による同意を書面で得た。また、ヒト資料については匿名化を行った。今年度実施分については各分担研究者が所属機関とカウンターパートの機関において倫理審査を得た上で研究を開始するべく準備中である。動物実験についても各所属機関の動物実験審査の承認を得てから実施した。なお、計画にはヒトゲノム・遺伝子解析も含んでいる

● ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針

- 疫学研究に関する倫理指針
- 遺伝子治療臨床研究に関する指針
- 臨床研究に関する倫理指針
- 疫学・生物統計学の専門家の関与有
- 臨床研究登録予定無

C. 研究結果

各研究領域において出版された主な論文と本年度の活動成果をまとめた。このうち代表者のわかる範囲で日米での協力が見られるものに星印を付した。またアジアの研究者には網

掛けを付けている。

(1) マラリア

- ☆マラリア 1. Tsuboi T, Takeo S, Iriko H, Jin L, Tsuchimochi M, Matsuda S, Han ET, Otsuki H, Kaneko O, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Sawasaki T, Torii M, Endo Y. Wheat germ cell-free system-based production of malaria proteins for discovery of novel vaccine candidates. *Infect Immun*. 2008, 76:1702-170
- マラリア 2. Iriko H, Kaneko O, Otsuki H, Tsuboi T, Su XZ, Tanabe K, Torii M. Diversity and evolution of the rhoph1/clag multigene family of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 158(1):11-21, 2008
- マラリア 3. Hisaeda H, Tetsutani K, et al. Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol*. 180: 2496-2503, 2008.
- マラリア 4. Tetsutani K, Ishiwata K, Torii M, Hamano S, Hisaeda H, Himeno K. Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* modulates murine host response against *Plasmodium berghei* ANKA infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79: 819-822, 2008.
- マラリア 5. Jangpatarapongsa K, Chootong P, et al. *Plasmodium vivax* parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol*. 38: 2697-2705, 2008.
- マラリア 6. Miyakoda, M., Kimura, D., Yuda, M., Chinzei, Y. Shibata, Y., Honma, K., Yui, K. Malaria-specific and non-specific activation of CD8⁺ T-cells during infection with *Plasmodium berghei*. *J. Immunol.*, 181(2) : 1420-1428, 2008.
- マラリア 7. Honma, K., Kimura, D., Tominaga, N., Miyakoda, M., Matsuyama, T., Yui, K. Interferon regulatory factor-4 differentially regulates the production of Th2 cytokine in naïve vs. effector/memory CD4⁺ T-cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105: 15890-15895, 2008.
- マラリア 8. Cao J, Kaneko O, Thongkukiatkul A, Tachibana M, Otsuki H, Gao Q, Tsuboi T, Torii M. "Rhoptry Neck Protein RON2 forms a complex with microneme protein AMA1 in *Plasmodium falciparum* merozoites." *Parasitology International* (in press) (2008).
- マラリア 9. Mphande FA, Ribacke U, Kaneko O, Kironde F, Winter G, Wahlgren

M. "SURFIN₄, a schizont-merozoite associated protein in the SURFIN family of *Plasmodium falciparum*." *Malaria Journal* 7:116 (2008).

愛媛大学無細胞生命科学研究センター
教授 坪井敬文

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を何ら改変することなくゲノムワイドに組換えタンパク質として発現することに成功した。これまで発現に成功した熱帯熱マラリア原虫組換えタンパク質の内、メロゾイト期の組換えタンパク質 114 種をモデルに用いて、我々が確立したハイスループット抗原スクリーニング法（アルファスクリーン法）により、タイから得られたマラリア免疫血清を用いて熱帯熱マラリア原虫の新規抗原タンパク質のスクリーニングを試行した。その結果、機能未知の原虫分子の中に、既知のワクチン抗原分子に匹敵する高い抗原性を有する分子を検出することに成功した。

愛媛大学大学院医学系研究科教授 鳥居本美
マラリア原虫メロゾイトの赤血球結合分子

EBL (EBL: Erythrocyte Binding-Like) は赤血球侵入に必須とされる分子である。急激な原虫感染率の上昇により致死性的となる強毒株

(17XL) と致死的でない弱毒株 (17XNL) の PyEBL 分子の塩基配列を比較したところ、オープンリーディングフレーム内で唯一、C 末端部の Cys に富む領域 (第 6 領域) 内のアミノ酸の一つが異なり、17XNL 株では Cys であるのに対し 17XL 株では Arg であることを見出した。免疫電子顕微鏡写真で詳細な局在を調べたところ、17XNL 株では PyEBL はマイクログネームに局在する一方、17XL 株ではデンスグラニュールに局在することを見出した。そこで、PyEBL の第 6 領域のアミノ酸を置換した遺伝子改変原虫を作成して詳細に検討した結果、第 6 領域のアミノ酸の変異が PyEBL 分子の細胞内輸送を変化させること、またマラリア原虫の赤血球への侵入動態に影響を及ぼし、さらには宿主への病原性にも変化をもたらすことが明らかとなった

九州大学医学研究院准教授 久枝 一

マラリア原虫の免疫回避はワクチン開発の妨げになっている。本研究では制御性 T 細胞の活性化による免疫回避の詳細なメカニズムを解析した。マラリア原虫感染赤血球が樹状細胞

に TLR9 を介して相互作用し、その結果樹状細胞が制御性 T 細胞を活性化することを示した。さらに TLR9 欠損マウスでは制御性 T 細胞の活性化が起こらず致死性感染に部分的に抵抗性を示すことも明らかにした。

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授

由井 克之

マラリア感染において、CD8⁺ T 細胞は脳マラリア発症に重要な役割を担っていることが知られているが、その詳細は明らかではない。抗原特異的な CD8⁺ T 細胞の活性化とマラリア病態への関与を明らかにする目的で、モデル抗原をマウスマラリア原虫 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) に導入して新たなモデル実験系を作成した。このモデルを用い、マラリア感染時に抗原特異的・非特異的 CD8⁺ T 細胞の活性化機構と、それらのマラリア病態への寄与を明らかにした。

蠕虫感染防御においては、Th2 型免疫応答が重要な役割を有している。Th2 応答の誘導機構について明らかにするため、転写因子

Interferon regulatory factor-4 (IRF-4) 遺伝子に着目して研究を行った。IRF-4 欠損マウスでは、CD4⁺ T 細胞の Th2 への分化が完全に欠如している。しかしながら、IRF-4 欠損マウスのナイーブ CD4⁺ T 細胞は T 細胞受容体 (TCR) 刺激に反応して IL-4 を産生する能力があることを明らかにした。さらに、IL-4 産生において、ナイーブ CD4⁺ T 細胞と記憶 CD4⁺ T 細胞とで IRF-4 は異なる機能を有しており、ナイーブ CD4⁺ T 細胞では抑制的に、記憶 CD4⁺ T 細胞では促進的に働くことを明らかにした。

長崎大学熱帯医学研究所 教授 金子 修
マラリア原虫はヒト体内では赤血球への再侵入を繰り返すことで増殖するため、赤血球侵入の分子機構を詳細にすることは、ワクチン開発や創薬への基盤情報を提供することとなる。マラリア原虫が赤血球に侵入の際には、原虫と赤血球との間に移動接合体と呼ばれる構造を形成するが、この形成に関与すると思われる分子群について解析した。

(2) 住血吸虫症

- 住血 1. Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of

Schistosomiasis japonica vaccine candidate antigen. Parasitology International. in press, 2009

- 住血2. Kumagai T, Osada Y, Ohta N, Kanazawa T. Peroxiredoxin-1 from *Schistosoma japonicum* functions as a scavenger against hydrogen peroxide but not nitric oxide. *Mol. Biochem Parasitol*, 164:26-31, 2009.
- 住血3. Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *Int J Parasitol* 164:457-464, 2009.

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科国際環境寄生虫病学分野 太田伸生

住血吸虫が血管内寄生を成立させる機序として、ヒトを含むほ乳類宿主からの酸化ストレスの回避が重要であるという仮定に基づいて、日本住血吸虫の酸化ストレス回避に直接関与する peroxiredoxin (Prx) の遺伝子ノックダウンによる効果を検討した。住血吸虫の寄生病態を解析するために in vivo の RNAi が方法的に確立する必要がある、そのための検討をすすめた。Prx-1、Prx-2 の dsRNA を住血吸虫感染マウスにさまざまな方法で投与することにより、同遺伝子に対して一定の発現抑制をかけることが観察され、その結果として寄生虫体数には変化を生じなかったが、寄生住血吸虫による産卵抑制効果が認められた。In vivo RNAi の効果改善を図る目的で住血吸虫の RNA 取込みに関する生物学的システムを検討することを試み、*C. elegans* の情報をもとに日本住血吸虫の *sid* 遺伝子の解析を進めた。

(3) フィラリア症

- フィラリア 1. Presence and gradual disappearance of filaria-specific urinary IgG4 in babies born to antibody-positive mothers: A 2-year follow-up study. Mirani V, Weerasooriya, Makoto Itoh, Mohammad Z. Islam, Yoshiki Aoki, Wilfred A. Samarawickrema, Eisaku Kimura. *Parasitol Int* 2008; 57: 386-389.
- フィラリア 2. Distribution of filarial elephantiasis and hydrocele in Matara district, Sri Lanka, as reported by local leaders, and an immunological survey in areas with relatively high clinical rates. Mirani V, Weerasooriya, Yoshinori Isogai, Makoto Itoh, T. Channa Yahathugoda, Kanchana K. Vidanapathirana, Malka P.S.

Mudalige, Eisaku Kimura. *Parasitol Int* 2008; 57: 390-395.

愛知医科大学医学部教授 木村英作
スリランカの低流行地において住民のアンケート調査により陰嚢水腫等の患者数を調べた。同時に、医師による検診、免疫診断法(尿 ELISA)を実施した。結果の比較により、住民情報が十分信頼できることが示された。(ii) 年一回の集団治療を6回以上繰り返すと感染率の著明な減少が認められた。(iii) デニヤヤ地方において尿 ELISA 陽性の学童とその家族を再調査した。全員陰性であった。(iv) 東チモール国では、全国より抽出された中学校において尿 ELISA を実施し、フィラリア症の全国的な分布状況を明らかにした。

(4) 住血原虫症(トリパノソーマ、リーシュマニア)

- 住血原虫 1. Myint CK, Asato Y, Yamamoto Y, Kato H, Bhutto AM, Soomro FR, Memon MZ, Matsumoto J, Marco JD, Oshiro M, Katakura K, Hashiguchi Y, Uezato H: Polymorphisms of cytochrome *b* gene in *Leishmania* parasites and their relation to types of cutaneous leishmaniasis lesions in Pakistan. *J Dermatol* 35, 76-85, 2008
- 住血原虫 2. Bawm S, Matsuura H, Elkhateeb A, Nabeta K, Subeki, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: *In vitro* antitrypanosomal activities of quassinoid compounds from the fruits of a medicinal plant, *Brucea javanica*. *Vet Parasitol* 158, 288-294, 2008
- 住血原虫 3. Bhutto AM, Soomro FR, Katakura K: Leishmaniasis in Sindh, Pakistan: outbreak and review of the literature. *J Pak Assoc Dermatol*, 18, 212-219, 2008
- 住血原虫 4. Nakao R, Mizukami C, Kawamura Y, Subeki, Bawm S, Yamasaki M, Maeda Y, Matsuura H, Nabeta K, Nonaka N, Oku Y, Katakura K: Evaluation of efficacy of bruceine A, a natural quassinoid compound extracted from a medicinal plant, *Brucea javanica*, for canine babesiosis. *J Vet Med Sci* 71, 33-41, 2009
- 住血原虫 5. Katakura K: Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). *Curr Opin Infect Dis* in press
- 住血原虫 6. Kim CM, Blanco LB, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan

X, Igarashi I. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Vet Parasitol.* 151:158-163, 2008.

- 住血原虫 7. Iseki H, Takabatake N, Ota N, Ishigame T, Yokoyama N, Igarashi I. *Babesia*: The protective effects of killed *Propionibacterium acnes* on the infections of two rodent *Babesia* parasites in mice. *Exp Parasitol.* 118:543-548, 2008.
- 住血原虫 8. Goo YK, Jia H, Aboe GO, Terkawi MA, Kuriki K, Nakamura C, Kumagai A, Zhou J, Lee EG, Nishikawa Y, Igarashi I, Fujisaki K, Xuan X. *Babesia gibsoni*: Serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immuno-sorbent assay with recombinant BgTRAP. *Exp Parasitol.* 118:555-560, 2008.
- 住血原虫 9. Salim BO, Hassan SM, Bakheit MA, Alhassan A, Igarashi I, Karanis P, Abdelrahman MB. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitol Res.* 103:1145-1150, 2008.
- 住血原虫 10. Takabatake N, Iseki H, Ikehara Y, Kanuka H, Yokoyama N, Sekimizu K, Igarashi I. Isolation and pathogenic characterization of an OBl variant of *Babesia rodhaini* which has a glycophorin A-independent pathway to murine red blood cells. *Vet Parasitol.* 159:97-104, 2009.
- 住血原虫 11. Inaoka DK, Sakamoto K, Shimizu H, Shiba T, Kurisu G, Nara T, Aoki T, Kita K, Harada S. Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. *Biochemistry*, 47 (41): 10881-10891, 2008
- 住血原虫 12. Makiuchi T, Annoura T, Hashimoto T, Murata E, Aoki T, Nara T. Evolutionary analysis of synteny and gene fusion for pyrimidine biosynthetic enzymes in Euglenozoa: An extraordinary gap between kinetoplastids and diplomonads. *Protist*, 159(3): 459-470, 2008

北海道大学大学院獣医学研究科教授 片倉賢

パキスタン中南部のインダス河低地流域における *Leishmania (L.) major* を主な原因とする皮膚リーシュマニア症の新しい流行地においてサンチョウウバエの調査を行った。その結果、

Phlebotomus 属と *Sergentomyia* 属のサンチョウウバエが生息し、どちらも人を含む複数種の動物から吸血していることが明らかになった。また、薬用植物の *Brucea javanica* の乾燥種子抽出物から分離・精製したクアシノイドについて *Trypanosoma evansi* に対する *in vitro* における増殖抑制効果を検討した。その結果、C20 クアシノイドには低濃度で抗トリパノソーマ活性を示す化合物があり、構造的な特徴として ring A における diosphenol の存在ならびに C15 側鎖の性質がその活性に重要であることが明らかになった。

帯広畜産大学 教授 五十嵐郁男

グライコポリリン A(GPA)欠損マウスに致死性マウスバベシア原虫 *B. rodhaini* を感染させても、赤血球への侵入が認められず、マウスバベシア原虫の赤血球への侵入に GPA が重要である事が報告されていた。今回、*B. rodhaini* 感染実験を GPA 欠損マウスで繰り返す過程で、赤血球寄生を示す GPA 欠損マウス 1 頭が認められ、バベシア原虫は GPA 以外にも赤血球膜分子を侵入標的にしている可能性がある事が示唆された。また、*P. acnes* の接種によりバベシア感染に対する感染抵抗性が認められ、今後特異抗原との併用により、更なる感染防御効果が期待される。更に、ウマバベシア *T. equi* に対する Real-time PCR 法が確立され、定量的な遺伝子検出が可能となった。

また、従来の ELISA よりも感度の高い大バベシア原虫 *B. gibsoni* の BgTRAP を用いた ELISA 法が確立された。スーダンの馬ピロプラズマ症の疫学調査を ELISA 法と PCR 法を用いて行い、その有用性が認められた。

順天堂大学大学院医学研究科 准教授 奈良武司

寄生原虫トリパノソーマのゲノムは、特有のシンテニー構造（種間を通じて遺伝子が染色体上で同一方向に並び、数百 kb に渡って遺伝子の順序が保たれている）を持つことが明らかとなった。本研究ではシンテニー構造の成立起源について、ピリミジン合成酵素遺伝子クラスターをモデルとした解析から、シンテニー構造がキネトプラスチダ類の共通祖先で成立した可能性を示した。

- (5) 新興・再興感染症（腸管寄生原虫症、腸管寄生ぜん虫症、エキノコックス症、人獣共通感染症など

- ☆新興1. Ebert, F., Bachmann, A., Nakada-Tsukui, K., Hennings, I., Drescher, B., Nozaki, T., Tannich, E., and Bruchhaus, I. (2008) An *Entamoeba* cysteine peptidase specifically expressed during encystation. *Parasitol. Int.* 57, 521-524
- 新興2. Nkouawa A et al. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 168-174.
- 新興3. Sudewi AAR et al. *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia: serology and mtDNA analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 96-98.
- 新興4. Hüttner M et al. Genetic characterization and phylogenetic position of *Echinococcus felidis* Ortlepp, 1937 (Cestoda: Taeniidae) from the African lion. *Int J Parasitol* 2008; 38: 861-868.
- 新興5. Moro P et al. Molecular identification of *Echinococcus canadensis* and haplotypes of *E. granulosus* sensu strict (G1) and *E. canadensis* (G6) from Peru. *Parasitol Int* 2009; in press.
- 新興6. Yamasaki H et al. Genetic analysis of *Echinococcus multilocularis* originating from a patient with alveolar echinococcosis occurring in Minnesota in 1977. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 245-247.
- 新興7. Li TY et al. Species identification of human echinococcosis using histopathology and genotyping in northwestern China. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 585-590.
- 新興8. Boufana BS et al. Evaluation of three PCR assays for the identification of the sheep strain (Genotype 1) of *Echinococcus granulosus* in canid feces and parasite tissues. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 777-783.
- 新興9. Tappe D et al. Close relationship between clinical regression and specific serology in the follow-up of patients with alveolar echinococcosis in different clinical stages. *Am J Trop Med Hyg* 2009; in press.
- 新興10. Sako Y et al. Development of an immunochromatographic test to detect antibodies against recombinant Em18 for diagnosis of alveolar echinococcosis. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 252-254.
- 新興11. Craig PS et al. Echinococcoses and Tibetan communities. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1674-1675.
- 新興12. Giraudoux P et al. Small

mammal assemblages and habitat distribution in the northern Junggar basin, Xinjiang, China: a pilot survey. *Mammalia* 2008; 72: 309-319.

旭川医科大学寄生虫学講座教授 伊藤 亮
脳嚢虫症とエキノコックス症は、地球規模で環境汚染、流行拡大が年々深刻化しており、WHOにより狂犬病その他とともに Neglected Tropical Diseases にリストアップされた人獣共通寄生虫疾患である。本研究では、これらの寄生虫疾患についての病態、診断、治療、予防に向けた総括的な研究として、免疫、遺伝子診断法の改善、病原体である寄生虫の遺伝子多型解析による感染地域の特定の可能性について研究を実施した。嚢虫症を引き起こす有鉤条虫(*Taenia solium*)は、ミトコンドリア遺伝子解析によりアジア型およびアメリカ・アフリカ型に分けることができるが、さらにそれぞれの地域内でのサブタイピングにより、患者の旅行歴と照らし合わせることで感染した地域を特定できるようになった。また、人体寄生テニア属条虫3種の遺伝子鑑別法も確立した。エキノコックス属条虫に関するミトコンドリア遺伝子解析を中心とする種の再検討を行い、アフリカライオンから分離されていた単包条虫ライオン strain を独立種として再評価した。単包条虫ゲノタイプ G1-G10 と呼ばれていたものを4種類に再分類し、全世界に分布しているエキノコックス属条虫を9種類に再分類した。これらの基礎研究成果に基づき、患者確認に必要な血清抗体検査法、遺伝子検査法の改善、開発に取り組み、感染者、感染動物の検出精度が大きく向上した。今後、致死的な人獣共通幼条虫症を引き起こす一群の条虫に関して、遺伝子多型解析に基づく地球規模での地理拡散、進化、病原性の獲得機序、宿主転換などの研究へと発展することが期待できる。

(6) ベクター

- ベクター1. Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* 111(4): 2007-2014, 20

自治医科大学・教授 松岡 裕之
遺伝子導入技術により人類に有用なワクチン蛋白を蚊につくらせ、吸血とともにワクチン

蛋白を注入してくれる蚊のモデルをつくるため、蚊の唾液腺特有蛋白遺伝子のプロモーター領域に、マラリア蛋白遺伝子をつないでハマダラカ受精卵に注射し、遺伝子入蚊を作成した。唾液腺にはマラリア蛋白が1ng程度発現していたが、マラリア蛋白の唾液への移行はみられなかった。唾液腺で産生された外来蛋白を唾液中に分泌させる技術をさらに開発する必要がある

D.考察

本年度の事業活動はほぼ計画通りに遂行された。研究計画の2年目にあたり、特にアジア地域に流行する寄生虫疾患とりわけ、以下にあげた、住血吸虫症、フィラリア症、マラリア、新興再興寄生虫病、ベクターの各研究領域で研究を遂行した。昨年度カリフォルニア大学デービス校で開かれた合同会議では、多数の日本の若手の研究者による発表を行い今後の共同研究への展開を図った。今後の日本からのポストドクの派遣や共同研究の推進に著しく寄与するものと期待される。本年度出版された論文を見ても日本とアジア各国の研究者との共同研究が多くみられるし、活動報告書にもアジアでの研究報告が増加していることは明らかである。これにさらに日米の共同研究を加えていく努力を今後していきたい。日米およびアジアの3角協力による優れた論文の産出を本研究事業の成果の指標とすることとしたい。次年度以降このような指標を用いて成果をまとめていきたい。

E.結論

アジアに蔓延する広範囲な寄生虫疾患を対象にした分子レベルから公衆衛生レベルまでの活発な研究が行われ、本プログラムが各研究グループの間の情報交換や新しいプロジェク

トの提案、若手研究者の育成に重要な役割を果たした。

F.健康危険情報

なし。

G.研究発表

既述。

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特許名称：Th2細胞誘導用組成物およびTh2型疾患の治療組成物、ならびにこれらの利用。

発明者名：善本知広、中西憲司

権利者名：兵庫医科大学

出願番号：特願2008-281930 出願年月日：2008.10.31

特許名称：実験動物の腸管癒着を形成する方法、腸管癒着実験動物の製造方法、腸管癒着抑制剤のスクリーニング方法及び腸管癒着抑制剤。

発明者名：善本知広、藤元治朗、中西憲司

権利者名：兵庫医科大学

国際出願番号：PCT/JP2008/05229 出願年月日：2008.2.14

特許名称：新規抗住血吸虫剤。

発明者名：綿矢 有佑、金 惠淑、平本晃子、佐藤聡、太田伸生、熊谷貴、下河原理江子、谷口資恵。

出願番号：特願 2008-172663。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

寄生虫症感受性の宿主因子の検討に関する研究

研究分担者 平山 謙二 長崎大学・熱帯医学研究所・免疫遺伝学分野 教授

研究要旨

住血吸虫症は中間宿主の淡水産巻貝から放出される感染型幼虫 (セルカリア) の経皮感染によって引き起こされるぜん虫感染症で中国揚子江流域、フィリピンなどに分布する日本住血吸虫症である。感染によって直接死に至る事はないが、感染を繰り返した結果、数年後に発症する肝硬変が致死的となる。フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州は 2005~2006 年に千種らが行った 1500 名に及ぶ住血吸虫症の超音波診断の結果、10 歳代においてネットワークパターン(NW)を示す肝線維化症患者が 12.3%、20 歳以上では 55.3%が存在する浸淫地であることが報告されている。この対象集団に対し HLA-DRB1 アレルタイピングによる、相関解析を行った結果、加齢による肝線維化症の影響のない 15~35 歳の群で HLA-DRB1*1501 の頻度が非線維化症群 (30.4%) と比較して線維化症群で 52.9%と有意に増加していた ($P<0.004$, $OR=2.732$)。早期肝線維化症発症には HLA-DRB1*1501 によって提示された虫卵抗原による T 細胞応答性が、肝線維化症の発症に関与していると考えられる結果を得た。

A. 研究目的

住血吸虫性肝線維化症は感染を繰り返した結果、肝臓に蓄積された虫卵周囲に形成された結節の線維化が進行することによって発症し、この免疫応答は T 細胞に制御されていることが報告されている。我々はこれまでに中国の日本住血吸虫浸淫地において、HLA クラス II の特定のアレルが肝線維化症抵抗性あるいは感受性に相関することを報告している。

フィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州は高度浸淫地で、これまで住血吸虫症に対する十分な治療や防圧対策が取られていない。千種らが 2005~6 年に渡って行われた 1500 名 (3~84 歳) に及ぶ住血吸虫症の現地調査の結果、虫卵陽性率 (Kato-Katz) は全体の 6.3% 程度であったが、虫卵に対する抗体陽性率は 61.4%、10 歳代においてネットワークパターン (NW) を示す肝線維化症患者が 12.3%、

20 歳以上では 55.3%が存在する浸淫地であることが報告されている。この対象集団に対し、肝線維化症発症要因としての HLA 分子の関与を検証する目的で、HLA-DRB1 アレルタイピングによる相関解析を行った。

B. 研究方法

2005~6 年の現地調査で研究に対する同意が得られた対象者 314 人に対して、便中虫卵検査、超音波診断、血清抗体価検査を行い、ろ紙採血 (FTA カード) を行った。血清は独協医大にて ELISA 法にて抗虫卵抗体を検出し、FTA カードは長崎大・熱帯医学研究所にて DNA 抽出を行った。超音波診断は、大前らの論文に従って Type 0 から Type 3 に分類し、Type 3 であるネットワークパターン (NW) を示した患者を肝線維化症とした。HLAclassII-DRB1 領域をビーズアレイに

よる SSO 法 (Lab-type SSOIIB, ベリタス) を用いて DRB1 アレルを決定した。また、2007 年には、住血吸虫症有病者及び既往者に対象を限定しない一般健康診断、眼科検診、住血吸虫症検診を行い対照集団 (294 名) を設定し同様に試料を収集した。

現地調査及び採血、遺伝子解析等については、長崎大学・熱帯医学研究所・研究倫理委員会及びフィリピン大学での承認を得て行った。「フィリピンにおける住血吸虫性肝線維化症の遺伝的調節機構の解析」承認番号 04031002 長崎大学・熱帯医学研究所・研究倫理委員会。

C. 結果

2005~2006 年に住血吸虫症患者を対象として収集した 314 名のうち 15 歳以上で抗体価が陽性であった 288 名 (15~34 歳; 97 名、35 才以上; 191 名) を対象として解析を行った。住血吸虫性肝線維化症 (NW) は加齢による発症率の増悪が認められるため、加齢による影響を解析した。この結果、15~34 才の群では有意に抵抗性 (OR=0.24) を示し、35 才以上の群では、有意に感受性を示した (OR=3.01)。(表 1)

表 1 年齢別による肝線維化症危険率

Age	Total	NW	NOR	P value	OR	95%CI
15<34	97	51	46	<0.0001	0.24	0.20 - 0.56
35<	191	147	44	<0.0001	3.01	1.79 - 5.08
Total	288	198	90			

NW (肝線維化症) NOR (非線維化)

加齢による肝線維化症の影響のない 15~35 才の群で HLA-DRB1 アレル頻度を解析した結果、HLA-DRB1*1501 が線維化症群で 52.9% (27/51) と有意に増加していた (OR=2.73)。この結果が、試料収集の偏りによって起こったものではないことを確認するために、2007 年度に眼科検診とした対照群 (294 名) との、DRB1 タイピングのアレル頻度を比較したが、有意差が認められるようなアレルは認められなかった。このことから、住血吸虫症有病者や既往歴を対象として収集した試料であっても、同地域の平均的な遺伝的背景を示していると考えられた。

この、対照群中の住血吸虫症患者 (血清抗

体価陽性、虫卵陽性、肝線維化症: 151 名) を対象とした DRB1*1501 の頻度は、35 才未満の群 (36 名) で、同様に肝線維化症で非肝線維化症群 6.67% (1/15) と比較して 57.1% (12/21) と有意に増加していた (OR=18.67) (表 2)。

表 2 若年性肝線維化症群で示される DRB1*1501 の高頻度

DRB1*1501	15<34		35<	
	NW(%)	NOR(%)	NW(%)	NOR(%)
*2005~06	52.9	30.4	23.8	34.1
**2007	57.1	6.7	24.1	6.3

NW (肝線維化症) vs NOR (非線維化)

*15<34: p<0.004 OR=5.48 95%CI 4.68 - 17.87

*35< p<0.001 OR=2.73 95%CI 1.19 - 6.27

**15<34: p<0.004 OR=18.67 95%CI 2.06 - 169.34 **35<: p=NS OR=1.32 95%CI 0.48 - 3.68

D. 考察

フィリピンの住血吸虫浸淫地において、若年性肝線維化症発症には HLA-DRB1*1501 が関連していると考えられた。DRB1*1501 は中国の住血吸虫肝線維化症の感受性アレルと報告されており、DRB1*1501 によって提示された虫卵抗原による T 細胞応答性が、肝線維化症の発症に関与していることが示唆された。フィリピンで観察された、短期間の暴露と考えられるにも関わらず、発症する若年性肝線維化症に関与する DRB1*1501 に拘束された免疫応答を検証する必要があると考えられた。

今後、発症機構を解析するために、他の HLA 領域、また免疫応答関連遺伝子の宿主遺伝要因となる遺伝的多型解析や、虫卵結節の増悪をコントロールする免疫関連分子についても解析を進めていく。

E. 結論

フィリピンの住血吸虫浸淫地における、若年性肝線維化症発症には HLA-DRB1*1501 が関連していると考えられた。DRB1*1501 は中国の住血吸虫肝線維化症の感受性アレルとして報告されており、DRB1*1501 によって提示された虫卵抗原による T 細胞応答性が、肝線維化症の発症に関与していることが示唆された。DRB1*1501 の免疫応答性の特徴を明確化し、どの様な免疫応答が肝線維

化を増悪させるかについて検討を進めることにより、肝線維化治療または、予防に寄与しうる成果を得る事が期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

和文論文

平山謙二. 糸状虫症 (フィラリア症); Today's Therapy 2008 今日の治療指針 Ed by: 山口徹, 北原光夫, 福井次矢 p.190, 医学書院, 2008 年

英文論文

Yu C, Yin X., Kikuchi M., Hirayama K., Zhu Y. Isolation of the cDNAs encoding secreted and membrane binding proteins from egg of *Schistosoma japonicum* (Chinese strain), Acta Parasitol. 53(1): 110-114 2008.

Nguyen TPL, Kikuchi M, Vu TQH, Vu TTN, Hoang ND, Do QH, Tran TT, Vo T, Cao N, Tran D, Oyama T, Morita K, Yasunami M, Hirayama K. Protective and Enhancing HLA-alleles, HLA-DRB1*0901 and HLA-A*24, for Severe Forms of Dengue Fever, Dengue Hemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome. PLoS Neglected Tropical Diseases. Volume 2 (10), e304, 2008.

Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Yu C, Chen H, Nara T, Arakawa T, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of *Schistosomiasis japonica* vaccine candidate antigen. Parasitology International. in press, 2009

2. 学会発表

Hamed Abdel-Hafeez E, 菊池三穂子、渡部幹次、伊藤 敬、平山謙二. 新規日本住血吸虫症感染防御ワクチン候補分子の探索. 第 77 回日本寄生虫学会大会、2008 年 4 月 3 - 4 日、長崎ブリックホール、長崎県

原国哲也、菊池三穂子、奈良武士、宮田健、平山謙二、新川武. 日本住血吸虫パラミオシン抗原を用いた粘膜ワクチン

に関する研究 第 77 回日本寄生虫学会大会、2008 年 4 月 3 日-4 日、長崎ブリックホール、長崎県

Abdel-Hafeez EH, Kikuchi M, Watanabe K, Ito T, Nara T, Arakawa T, Yu C, Chen H, Aoki Y, Hirayama K. Proteome approach for identification of protective vaccine candidate antigens for *Schistosoma japonicum* infection. ICTM2008, International Congress for Tropical Medicine and Malaria. September 29 ~ October 3, 2008, International Convention Center Jeju, Jeju island, Korea

菊池三穂子, エクラス・ハメド・ハーフィス, 渡部幹次, 伊藤敬, 奈良武司, 平山謙二. 日本住血吸虫の放射線照射セルカリアに誘導される感染防御機構の解析 —新規ワクチン候補分子の解析— 第 7 回分子寄生虫・マラリアフォーラム 2008 年 10 月 10 - 11 日、松山市男女共同参画推進センター、愛媛

菊池三穂子, エクラス・ハメド・ハーフィス, 渡部幹次, 伊藤敬, 奈良武司, 平山謙二. プロテオーム解析による日本住血吸虫症感染防御ワクチン候補分子の探索 第 6 1 回 寄生虫学会 南日本支部会大会 11 月 1 - 2 日、沖縄産業支援センター、沖縄

菊池三穂子、余伝心、陳紅根、平山謙二. 日本住血吸虫のゲノム解析 —何が何処までわかる?— 第 2 回蠕虫研究会 2008 年 11 月 7 - 8 日、サンマルク宮崎、宮崎

Kikuchi M, Watanabe K, Abdel-Hafeez EH, Boamah D, Chen H, Yu C, Hirayama K. Analysis of protective immunity induced by gamma-irradiated cercaria immunization with *Schistosoma japonicum* infection in miniature pigs. US-Japan Cooperative Medical Science Program. January 7-8, 2009, National Institute of Health, Tokyo

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
(社会保障国際協力推進研究事業 (国際医学協力研究事業))
分担研究報告書

原虫症治療標的分子の機能解析

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要な不可欠である事から特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになった。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、寄生原虫ミトコンドリアが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させることによって宿主内の環境に適応していることを明らかにしてきた。この成果をふまえマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析することにより、最終的に化学療法標的として捉えたいと考えている。そこで、熱帯熱マラリア原虫におけるエネルギー代謝系を先端的なエネルギー転換系研究の視点から追求し、さらにトリパノソーマなど他の寄生原虫も含め寄生現象全般に共通する適応戦略の分子基盤とその多様性を明らかにする事を目的として研究を進めている。

B. 研究方法

赤血球内型マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は化学療法剤の標的として期待されている。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたものであり、これが研究の進展を妨げ

ている。そこで活性を保持したミトコンドリアの単離法を確立し、各種阻害剤の効果を生化学的な解析を可能にした。一方、最近マラリア原虫にはアピコプラストと呼ばれる 35 kb の環状 DNA を持つオルガネラが存在し、マラリア原虫の増殖に必要な機能を有している事が判って来た。また、電子顕微鏡による観察から両者が細胞の中で常に近傍に局在している事が報告されている。そこでこれまでの成果をふまえ、引き続きこの2つのオルガネラの相互作用を調べ、さらにそれぞれの機能を独立に解析する目的で細胞分画における挙動を調べた。

また、アフリカトリパノソーマに関しては、極めて低濃度で効果を示す抗トリパノソーマ薬アスコフラノンの標的であるシアン耐性酸化酵素のタンパク質としての性質を調べる目的で、これまでに組換え酵素を用い高純度で高活性の酵素の精製法を確立した。今年度はこの精製標品を用いて、その酵素学的性質、またアスコフラノンによる阻害機構を調べ、さらに部位特異的変異を用いて活性発現に必要なアミノ酸残基を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究はすべてが in vitro の実験系であり、

倫理面の問題はない。

C. 研究結果

熱帯熱マラリア原虫の培養系から単離した粗ミトコンドリア画分を用い、ミトコンドリアとアピコプラストの相互作用を調べる目的でパーコールによる分離に対する細胞破碎条件などを含む、種々の処理、薬剤の効果を検討した。ミトコンドリアに関してはジヒドロオロト酸脱水素酵素およびジヒドロオロト酸-シトクロム *c* 還元酵素活性、またアピコプラストに関しては上述のフェレドキシンに対する抗体および 35Kb の環状 DNA 上の塩基配列を増幅する PCR を用いてその挙動を調べた。昨年度の結果から、 N_2 キャビテーションによる細胞破碎をこれまでの 1200psi から 300psi に低下させても細胞破碎の効率は変化せず、またより障害の少ないミトコンドリアを得る事ができる点が明らかになったが、さらにパーコールによる分離を二回繰り返す事によって、これまで常に挙動が一致していたミトコンドリアとアピコプラストが異なった位置に分離された。この結果は最近得られたアピコプラスト DNA に結合するタンパク質 HU に対する抗体（名古屋大学佐々木成江博士より供与）を用いる事によって、より明確に示す事ができた。

アフリカトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素に関しては、これまでに確立した再現性が高く、常に高純度、高活性の標品の精製法を用いて大量の酵素の精製を行った。この精製標品を用いて含有金属の解析を行い、ICP-MS により 1 分子の酵素が 2 分子の鉄を含む事が明らかになった。さらに多くの生物種のシアン耐性酸化酵素で保存されているアミノ酸残基をアラニンに変え、その影響の解析を開始した。現在までに基質

であるユビキノリンに対する親和性の低下した変異株およびアスコフラノンに対する感受性の低下した変異株が得られている。

D. 考察

マラリア原虫のアピコプラストが常にミトコンドリアの近傍に局在している事は以前から判っていたが、その生理的意義は不明であった。これまでの結果から、その相互作用はかなり強固であり、生理的にも意義がある事が示唆されていたが、今回の結果は両者がある条件下では分離可能である事を示している。

我々が開発中のアスコフラノンは、現在最も強力な抗トリパノソーマ薬とされ、その標的はトリパノソーマのミトコンドリアに局在するシアン耐性酸化酵素である。しかしそのタンパク質としての性質は酵素が極めて不安定であるため、ほとんど判っていなかった。今回の結果は本酵素が鉄を 2 分子含む di-iron タンパク質である事を明確に示した初めての報告である。また、部位特異的変異株を用いた解析はまだ開始したばかりであるが、基質であるユビキノリンや阻害剤であるアスコフラノンの結合に関わるアミノ酸残基に関する情報から、アスコフラノンの作用機構に関する重要な知見が得られつつある。

E. 結論

寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Change of subunit composition of mitochondrial complex II (Succinate-ubiquinone reductase/Quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host. Iwata F., Shinjyo N., Amino H., Sakamoto K., Islam M. K., Tsuji N. and Kita K. (2008) Parasitol. Int. 57, 54-61
- 2) Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis. Matsumoto J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., Kita K. and Oku Y. (2008) Antimicrob. Agents. Chemother. 52, 164-170
- 3) Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo₂) of the cytochrome *b* gene. Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, Kita K., and Marzuki S. (2008) Parasitol. Int. 57, 229-232
- 4) A cryptic algal group unveiled: a plastid biosynthesis pathway in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. Matsuzaki M., Kuroiwa H., Kuroiwa T., Kita K. and Nozaki H. (2008) Mol. Biol. Evolution 25, 1167-1179
- 5) Malaria parasites reproduce with the same manner as flowering plants. Hirai M., Arai M., Mori T., Kawai S., Kita K., Kuroiwa T. and Matsuoka H. (2008) Current Biol. 18, 607-613
- 6) Coinfection with nonlethal murine malaria parasites suppresses pathogenesis caused by *Plasmodium berghei* NK65. Niikura M., Kamiya S., Kita K. and Kobayashi F. (2008) J. Immunol. 180, 6877-6884
- 7) Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: Atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. Inaoka, D. K., Sakamoto, K., Shimizu, H., Shiba T., Kurisu, G., Nara, T., Aoki, T., Kita, K. and Harada, S. (2008) Biochemistry 47, 10881-10891
- 8) Screening of detergents for solubilization, purification and crystallization of membrane proteins: a case study on succinate:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. Shimizu, H., Nihei, C., Inaoka, D. K., Mogi, T., Kita, K. and Harada, S. (2008) Acta Crystallographica F64, 858-862
- 9) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ômura, S. and Kita, K. FEMS Microbiol. Lett. in press
- 10) Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita K. J. Biochem. in press

- 11) Antibiotics LL-Z1272 identified as novel inhibitors discriminating bacterial and mitochondrial quinol oxidases. Mogi, T., Ui H., Shiomi, K., Ōmura, S., Miyoshi, H. and Kita, K. *Biochim Biophys. Acta* (Bioenergetics) in press
- 12) Fasting induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking Acetyl-CoA Synthetase 2. Sakakibara, I., Fujino, T., Ishii, M., Tanaka, T., Shimosawa, T., Miura, S., Zhang, W., Tokutake, Y., Yamamoto, J., Awano, M., Iwasaki, S., Motoike, T., Okumura, M., Inagaki, T., Kita, K., Ezaki, O., Naito, M., Kuwaki, T., Chohnan, S., Yamamoto, T., Hammer, R. E., Kodama, T., Yanagisawa, M. and Sakai, J. *Cell Metabolism* in press
- 13) Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. *J. Biol. Chem.* in press
2. 学会発表
- 1) 北 潔 寄生虫の生活環におけるダイナミックなエネルギー代謝の変動 第81回日本生化学会大会第・31回日本分子生物学会年会 合同大会平成20年12月
- 2) Madhavi Paranagama, Kimitoshi Sakamoto, Kiyoshi Kita *Ascaris suum* quinol fumarate reductase can produce high amount of reactive oxygen species. 第81回日本生化学会大会第・31回日本分子生物学会年会 合同大会平成20年12月
- 3) Purification and crystallization of drug target trypanosome alternative oxidase (TAO) from *Trypanosoma brucei* Y. Kido, K. Sakamoto, S. Fujioka, M. Harada, D. Ohmori, F. Yamakura, H. Saimoto, Y. Yabu, T. Suzuki, S. Harada, K. Kita XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea
- 4) Novel subunit organization of the respiratory Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase) in *Trypanosoma cruzi* Morales, J., Sakamoto, K., Kita, K. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea
- 5) Toward anti-cryptosporidial chemotherapy by ascofuranone, specific and potent inhibitor against alternative oxidase (AOX) Harada, M., Fujimoto, Y., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Yabu, Y., Suzuki, T., Yoshinari, S., Kita, K. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria 2008, Sept. Cheju, Korea
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

マラリアの病態解明及びその治療をめざした研究

分担研究者 狩野 繁之 国立国際医療センター研究所 部長
研究協力者 三田村俊秀 国立国際医療センター研究所 室長

研究要旨： これまでに明らかにしてきた結果から、私たちは赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖において、オレイン酸は欠くことのできない血清中脂肪酸の1つであるという結論に至った。本研究では、原虫が良好に増殖できる条件下において常に検出されるステアリン酸からオレイン酸を合成する脂肪酸不飽和化活性の細胞増殖における機能を明らかにするために、その本体であると考えられるステアリン酸 ($C_{18:0}$) -CoA 不飽和化酵素 (stearyl-CoA desaturase) のノックアウト原虫の作成を行った。シングルクロスオーバーを介した遺伝子破壊が期待できる pHDWT ベクターを用いたコンストラクトの原虫への導入、WR99210 による正の選択のオン-オフの繰り返し、そして限外希釈によるクローニング、さらには PCR による各クローン株 gDNA の解析を行った。結果、ノックアウトコンストラクトがゲノム中の予想される部位に挿入されていることが示唆される原虫クローン株が確立できた。また、この原虫株は、通常の培養条件下に加えてウシ血清アルブミンに結合させた $60 \mu\text{M}$ のオレイン酸 ($C_{18:1, n-9}$) を添加した条件下で増殖できることが確認された。

A. 研究目的

マラリアの臨床症状とその複雑な病理は、病原因子であるマラリア原虫が生活環中の赤血球サイクルに入ることにより生じる。したがって、そのステージの原虫の増殖を押さえることが、直接の予防・治療戦略となる。私達は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖と脂質代謝・輸送との関連に着目し、それらを支えるユニークな分子機構について研究を継続している。

これまでの私達の研究により、(1) 赤血球期熱帯熱マラリア原虫が良好に増殖できる条件下においては、必須な血清中脂肪酸の1つであるオレイン酸 ($C_{18:1, n-9}$) をステアリン酸から合成する脂肪酸不飽和化活性が常に検出できること。(2) 赤血球期原虫が同調性を維持して良好な増殖を維持するために必要なパルミチン酸 ($C_{16:0}$ 、飽和脂肪酸) のパートナーは、オレイン酸 ($C_{18:1, n-9}$ 、不飽和脂肪酸) である必要があり、炭素鎖長が同じ 18 であるが不飽和の位置とその数がそれぞれ異なるパルミチン酸 ($C_{18:1, n-7}$) やリノール酸 ($C_{18:2, n-6}$) では代替できないこと、などを明らかにしてきた。そして、これらの結果からオレイン酸 ($C_{18:1, n-9}$) は、欠くことのできない血清中因子の一つであると結論してきた。

本分担課題においては、ステアリン酸からオレイン酸 ($C_{18:1, n-9}$) の合成に関与する脂肪酸不飽和化活性の赤血球期熱帯熱マラリア原

虫における機能を明らかにするために、その本体であると考えられるステアリン酸 ($C_{18:0}$) -CoA 不飽和化酵素 (stearyl-CoA desaturase) のノックアウト原虫の作成を行った。

B. 研究方法

塩基配列情報を基に、2つのノックアウトコンストラクトを作成した。(1) ダブルクロスオーバーを介した遺伝子破壊が期待できる pHHT-tk ベクターを利用し、PFE0555w 遺伝子座中の ORF の 5' 側上流領域、3' 側下流領域それぞれ約 550 bp、約 590 bp を熱帯熱マラリア原虫 Honduras-1 株ゲノムより PCR により増幅、塩基配列確認後ベクターに組み込んだ (pHHT-tk-2-(5R+3R) PfDes9)。

(2) シングルクロスオーバーを介した遺伝子破壊が期待できる pHDWT ベクターを利用し、PFE0555w 遺伝子座中の ORF 中の N-末端側のエキソンをほぼ包含する約 1010 bp を Honduras-1 株のゲノムより PCR により増幅、塩基配列の確認後、ベクターに組み込んだ (pHDWT-PfDes9-N2)。作成した 2 種類のプラスミドを電ポレーション法により、熱帯熱マラリア原虫 Honduras-1 株に導入後、各種薬剤による選択を行った。

(1) pHHT-tk-2-(5R+3R) PfDes9 については、WR99210 による正の選択後、25 日間非選択下で培養し、再び正の選択を行った。その後も

う一度 35 日間の非選択下での培養後、選択下で増殖する培養株を得た。その後、WR99210 による正の選択とガンシクロビルによる負の選択の両方の選択下で増殖する培養株を取得した。

(2) pHDT-PfDes9-N2 については、WR99210 による正の選択後、21 日間非選択下で培養し、再び正の選択を行った。その後同じ事をもう一度繰り返し選択下で増殖する培養株を得た。最初の非選択下での培養から、通常の培養条件に加えて、ウシ血清アルブミンに結合させた $60 \mu\text{M}$ のオレイン酸 ($\text{C}_{18:1, n-9}$) を添加した。

各コンストラクトのゲノムへの挿入、ならびに PFE0555w ORF の欠失については、各種のプライマーセットを用いた PCR により確認した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は国立国際医療センター研究所のバイオセーフティー委員会の許可を受けておこなった。

C. D. 研究結果および考察

マラリアゲノム情報のデータベース PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp>) 上には、1 つの stearyl-CoA desaturase 遺伝子 (PFE0555w) のみがアノテートされている。Genbank に登録されている 3 つの EST クローン (Accession NO. BQ576923, BU497933, BQ451948) ならびに、それらのギャップを埋める RT-PCR 産物の塩基配列の決定により、遺伝子構造を確認した。

確認した遺伝子構造を基に作成した pHHT-tk-2-(5R+3R) PfDes9 を原虫に導入した。最初の 25 日間の非選択下、それに続く正の選択下で増殖してきた培養株の gDNA の PCR 解析により、コンストラクトが、ゲノム上の PFE0555w 遺伝子座中の ORF の 5' 側上流領域、もしくは 3' 側下流領域の目的とされる位置に挿入されていることが確認された。これは、2 回目の非選択、選択後の培養株、さらには、正と負の双選択下で増殖してきた培養株でも確認された。

次に、正と負の双選択下で増殖してきた培養から、限外希釈法によるクローニングにより 34 のクローン株を樹立した。それぞれのクローン株の gDNA を PCR により解析した結果、全てのクローンにおいて、PFE0555w ORF が欠失していないという期待とは逆の結果が確認された。

この結果は、PFE0555w ORF の欠失は原虫にとって致死である可能性が考えられる。そこで、コンストラクトが原虫ゲノムへ挿入さ

れる過程においては、通常の培養条件に加えて、ウシ血清アルブミンに結合させた $60 \mu\text{M}$ のオレイン酸 ($\text{C}_{18:1, n-9}$) が常に存在する条件下で培養するという方法に変更した。

pHDWT-PfDes9-N2 を原虫に導入後、最初の 21 日間の非選択下、それに続く正の選択下で増殖してきた培養株の gDNA の PCR 解析を行った。結果、ゲノム上の PFE0555w ORF 中の期待される位置にコンストラクトが挿入されていることが示唆された。さらに、2 回目の非選択、選択後の培養株においても、またその後の限外希釈によるクローニングにより樹立した 12 株中 11 株においても同様の結果が得られた。この結果は、ノックアウトコンストラクトがゲノム中の予想される部位に挿入されていることが示唆される原虫クローン株が確立できた。また、この原虫株は、通常の培養条件に加えてウシ血清アルブミンに結合させた $60 \mu\text{M}$ のオレイン酸 ($\text{C}_{18:1, n-9}$) を添加した条件下で増殖できることが確認された。

現在は、得られた 11 クローン株中の 2 クローンについて、PFE0555w ORF が破壊されているかどうかをサザンハイブリダイゼーション、RT-PCR、などにより確認している。確認後は、放射性ラベルされたステアリン酸 ($\text{C}_{18:0}$) を用いた代謝ラベル実験に続く脂肪酸組成の解析により、ステアリン酸 ($\text{C}_{18:0}$) をオレイン酸 ($\text{C}_{18:1, n-9}$) へ変換する不飽和化活性が消失しているかを精査する。さらには、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖における影響について検討を加える予定である。

E. 結論

ステアリン酸 ($\text{C}_{18:0}$) -CoA 不飽和化酵素 (stearyl-CoA desaturase) のノックアウト原虫の作成を試み、ノックアウトコンストラクトがゲノム中の予想される部位に挿入されていることが示唆される原虫クローン株が確立できた。

F. 健康危険情報 (省略)

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし