

- Functional analysis of a putative cysteine protease receptor from *Entamoeba histolytica*. The XXth Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, Sept 13-17, 2009.
- Nozaki, T. Rab small GTPases and phosphatidylinositides regulate phagocytosis and membrane trafficking of virulence factors: their roles in the pathogenesis of amebiasis. XVIIIth Congress of Parasitology, Aguascalientes, Mexico, September 21-26, 2009.
- 津久井久美子、野崎智義 イノシトールリン脂質シグナルを介した赤痢アメーバ食餌制御機構 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 大阪、October 9-10, 2009.
- 見市文香、野崎智義 ミトコンドリア関連オルガネラの新規機能—赤痢アメーバ原虫"sulfosome"に存在する硫酸活性化経路—第82回日本生化学会大会 神戸、October 21-24, 2009.
- 岡田麻美、見市文香、Nirianne Marie Q. Palacpac、野崎智義、狩野繁之、三田村俊秀 赤血球期熱帯熱マラリア原虫の脂質滴の生合成と輸送 第82回日本生化学会大会 神戸、October 21-24, 2009.
- 津久井久美子、Aleyla Escueta、中野由美子、野崎智義 赤痢アメーバ等における小胞輸送の多様性と進化 第82回日本生化学会大会 神戸、October 21-24, 2009.
- 唐木剛、村野祥子、亀井加恵子、佐藤暖、野崎智義、原田繁春 *Entamoeba histolytica* 由来メチオニンガンマリアーゼ1と2のX線結晶構造解析 第82回日本生化学会大会 神戸、October 21-24, 2009.
- Shinjiro Hamano, Becker Stephen, Asgharpour Amon, Ocasio Yina P. R., Stroup Suzanne E., Mc Duffie Marcia, Houpt Eric: 赤痢アメーバの感染成立を規定する宿主因子に関する研究、第78回日本寄生虫学会
- Yoshinori Mitsui, Mitsumasa Miura, Yoshiki Aoki, Shinjiro Hamano: In vitro effects of artesunate on the survival of worm pairs and egg production of *Schistosoma mansoni*. 第9回あわじしま感染症免疫フォーラム
- 三井義則、三浦光政、青木克己、濱野真二郎、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) の成虫の生存期間及び虫卵の生産に与えるアルテスネイトのインビトロでの効果、第3回蠕虫研究会
- 濱野真二郎、下川周子、Haque Rashidul, Mondal Dinesh、カラ・アザールの発症を規定する内部環境因子に関する研究、第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム
- Shinjiro Hamano: Genetic control of resistance to intestinal amebiasis in inbred mice. The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases
- 濱野真二郎: 赤痢アメーバ症ならびにリーシュマニア症の研究 ~ 病原性発現機構ならびに感染防御機構の解明~、第3回 GCOE ワークショップ
- 下川周子、千馬正敬、石渡賢治、小林正規、濱野真二郎: Intestinal helminthic infection enables *Entamoeba histolytica* to settle in mice. 原虫感染免疫研究会
- 岡田麻美、見市文香、Nirianne Marie Q. Palacpac、野崎智義、狩野繁之、

- 三田村俊秀：赤血球期熱帯熱マラリア原虫の脂質滴の生合成と輸送. シンポジウム：寄生原虫の独特なゲノム・オルガネラ進化、第82回日本生化学会大会、神戸国際会議場、2009.10.21-24.
- 三田村俊秀：赤血球期熱帯熱マラリア原虫の脂質代謝. ワークショップ：宿主・組織特異性を規定する宿主・寄生体インターフェイスの分子基盤、第32回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009.12.9-12.
- 永宗喜三郎 “トキソプラズマ原虫における寄生適応の分子機構の解明” 第283回つくば分子生命科学セミナー 2009年2月、つくば
- 田原美智留、木下タロウ、永宗喜三郎 “トキソプラズマ感染における宿主細胞側GPIアンカーの与える影響” 第78回日本寄生虫学会 2009年3月、東京
- 大谷史江、井上幸次、八木田健司ほか：細菌性角膜炎からアcantアメーバ角膜炎に移行したと考えられる1例. 第46回日本眼感染症学会、大阪、2009年7月10～12日
- 井上幸次：教育講演「コンタクトレンズ関連角膜炎の診断と治療」. 第106回中国四国眼科学会、高松 2009年7月26日
- 井上幸次：特別講演「眼感染症における微生物の起因性について考える」. 第63回日本臨床眼科学会、福岡、2009年10月9日～12日
- 牧岡朝夫、熊谷正広、平糠和志、小林正規、竹内 勤：Entamoebaの脱嚢におけるコフィリンの発現解析：第42回日本原生動物学会大会(2009)
- 橘 裕司、柳 哲雄、Chamala Lama、小林正規、Jeevan Sherchand、平山謙二：ネパールのアカゲザルにおける Entamoeba nuttalli の感染状況：第50回日本熱帯医学会大会(2009)
- 牧岡朝夫、熊谷正広、平糠和志、小林正規、竹内 勤：Entamoebaのアクチン脱重合因子コフィリンの解析：第32回日本分子生物学会年会(2009)
- 長安英治、吉田彩子、西牧亜奈、柳川紗弥香、丸山治彦. ベネズエラ糞線虫の感染幼虫に発現している遺伝子の解析（ワークショップ「寄生蠕虫の宿主内環境への適応」）第78回日本寄生虫学会大会、2009年3月27-28日、法政大学市ヶ谷キャンパス（東京）
- 吉田彩子、長安英治、太田伸生、丸山治彦 CD4+CD25+制御性T細胞の Plasmodium chabaudi AS 感染における原虫排除機構に対する影響 第78回日本寄生虫学会大会、2009年3月27-28日、法政大学市ヶ谷キャンパス（東京）
- 丸山治彦 皮膚病変を来す寄生虫症（教育講演：ハンセン病、抗酸菌感染症と寄生虫感染症）第108回日本皮膚科学会総会、2009年4月24-26日、福岡国際会議場（福岡市）
- 長安英治、吉田彩子、丸山治彦. 発現遺伝子解析によるベネズエラ糞線虫の感染幼虫の生物学的分析. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム、2009年5月10-12日、ワールドコンベンションセンターサミット（宮崎市）
- 吉田彩子、堀井洋一郎、丸山治彦 ブタ回虫肺移行期幼虫 cDNA ライブラリーの構築と解析～新規 C-type レクチン遺伝子の同定～ 第20回日本生体防御学会学術総会、2009年7月25-26日、東京医科歯科大学湯島キャンパス（東京）
- Ayako Yoshida, Eiji Nagayasu, Yoichiro Horii, Haruhiko

- Maruyama: Gene expression analysis of lung stage larvae of *Ascaris suum*, the swine large intestinal roundworm. 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sep. 8-11, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan
- 丸山治彦 臨床検査で遭遇する寄生虫 (特別講演) 平成 21 年度日本臨床衛生検査技師会形態検査部門研究会、2009 年 9 月 20-21 日、宮崎大学医学部 (宮崎県清武町)
- 丸山治彦 寄生虫の謎に挑む (シンポジウム) 第 62 回日本寄生虫学会南日本支部大会、2009 年 11 月 7-8 日、福岡大学 (福岡市)
- 長安英治、吉田綾子、丸山治彦. Analyses of an astacin-like zinc metalloprotease of *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- 吉田彩子、大岡唯祐、長安英治、堀井洋一郎、林哲也、丸山治彦 Analysis of expressed sequence tags from the migratory larvae cDNA library of the parasitic nematode *Ascaris suum*. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- 長安英治、伊藤武彦、小椋義俊、吉田彩子、林哲也、丸山治彦. 第 2 世代シーケンサによるベネズエラ糞線虫ゲノムの解析 第 8 回感染症沖縄フォーラム、2010 年 2 月 11-13 日、沖縄国民年金健康センター (宜野湾市)
- 後藤 美穂、中嶋 みかげ、網野 比佐子、北 潔 「回虫における低酸素適
 応機構の解明に向けて」第 78 回日本
 寄生虫学会大会平成 21 年 4 月
 城戸康年、原田繁春、斎本博之、北 潔
 「抗アフリカトリパノソーマ薬アスコフラノンの薬剤開発とその薬剤標的 Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) の解析」第 78 回日本寄生虫学会大会平成 21 年 4 月
 北 潔 「低酸素適応におけるミトコンドリアの役割」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
 坂元君年、Huang, L. Zhang, K. Daldal, F.、北 潔 「*Rhodobacter capsulatus* を用いたコハク酸脱水素酵素の発現系の構築」第 82 回日本生化学 大会 平成 21 年 10 月
 大森惇子、岩田典子、大坪渉、網野比佐子、坂元君年、Islam MK、辻尚利、北潔 「ブタ回虫の宿主体内移行におけるミトコンドリア呼吸鎖の変動」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
 網野 比佐子、栗野 睦美、石井 直明、飯野 雄一、小原 雄治、北 潔 「線虫 *Caenorhabditis elegans* ミトコンドリア電子伝達系複合体 II フラビンタンパク質 (Fp) サブユニットの変異による精子機能不全」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
 坂井千香、冨塚江利子、宮岸真、北潔 「ヒト複合体 II Fp アイソフォームの機能解析」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
 Nakanishi K. NKT IFN- γ production in response to cecal cauterization induces intestinal adhesion formation by reciprocal regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) and tissue-type plasminogen activator (tPA).

- The 5th International Symposium on CD1/NKT Cells 2009.3 Kamakura
- Nakanishi K. Therapeutic Approach to Th1-Type Bronchial Asthma in Transiently Humanized Mice by Using Human Anti-Human IL-18 Antibody. (Symposium) The 9th World Congress on Inflammation 2009.7 Tokyo
- Nakanishi K. Parasitology. (Guest Speech) The 9th Awaji international forum on infection and immunity 2009.9 Awaji
- 中西憲司. アレルギー増悪機構の基礎からの解析.(特別講演) 第21回日本アレルギー学会春季臨床大会 2009.6 岐阜
- 善本知広, 中西憲司. スーパーTh1細胞とアレルギー. (シンポジウム) 第21回アレルギー学会春期臨床学術大会 2009.6 岐阜
- Yoshimoto T, Yasuda K, Nakanishi K. Contribution of basophils to Th2/IgE response in vivo by production of IL-4 and presentation of MHC class II/peptide complex to CD4+ T cells. The first Immune Regulation: Present and Future 2009.5 Osaka
- Yoshimoto T, Kosaka H, Fujimoto J, Nakanishi K. IFN- γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. 第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2009.7 京都
- Yoshimoto T, Kosaka H, Fujimoto J, Nakanishi K. IFN- γ is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. (Workshop) The 9th World Congress on Inflammation 2009.7 Tokyo
- Yoshimoto T, Nakanishi K. Basophils contribute to Th2-IgE responses in vivo as antigen-presenting cells. (Symposium) The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2009.12 Osaka
- Yasuda K, Sasaki Y, Kondo Y, Matsumoto M, Yoshimoto T, Nakanishi K. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. 第78回日本寄生虫学会大会 2009.3 東京
- Yasuda K, Sasaki Y, Kondo Y, Matsumoto M, Yoshimoto T, Nakanishi K. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. 第56回日本実験動物学会総会 2009.5 埼玉
- Yasuda K, Sasaki Y, Kondo Y, Matsumoto M, Yoshimoto T, Nakanishi N. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. 第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2009.6 京都
- Yasuda K, Kondo K, Yoshimoto T, Fujimoto J, Nakanishi K. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adoptive immune system. The 9th World Congress on Inflammation. 2009.7 Tokyo
- Yasuda K, Sasaki Y, Kondo Y,

- Matsumoto M, Yoshimoto T, Nakanish K. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2009.9 Hyogo.
- Yasuda K, Sasaki Y, Kondo Y, Matsumoto M, Yoshimoto T, Nakanishi K. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. 第65回日本寄生虫学会西日本支部大会. 2009.11 大阪
- 松本真琴, 佐々木由紀, 安田好文, 村松正道, 本庶佑, 善本知広, 中西憲司. ヲヱネズエラ糞線虫の排除における抗原抗体複合体の必要性. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009.12 大阪
- 田中英久, 善本知広, 安田好文, 藤盛好啓, 中西憲司. ヒト好塩基球におけるHLA-DR発現の検討. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009.12 大阪
- Ohmae H, Chigusa Y, Blas BL, Ducussin B, Sinuon M, Socheat D. Impact of Climate Changes on Schistosomiasis and other parasitic diseases, The 1st East Asian International Symposium on Climate Change and Health, July, 2009, Tsukuba.
- 大前比呂思 寄生虫症の疫学と対策 -マラリアと住血吸虫症対策の現場から- 第3回現象数理21世紀COEシンポジウム「感染症 -実像とモデリング分野の垣根を越えて-」2010年2月 東京
- Kwansa-Bentum, B., 北村 圭、熊谷 貴、下河原理恵子、朝日博子、Wilson, MD. 太田 伸生 : Preliminary studies on molecular epidemiology of chloroquine resistant malaria parasites in Ghana. 第78回日本寄生虫学会大会 東京、2009年3月
- Asahi, H.: Chemically defined medium for continuous intraerythrocytic growth of *Plasmodium falciparum*. 第78回日本寄生虫学会大会 東京、2009年3月
- 北村 圭、熊谷 貴、Bethel Bentum, K, 三田村俊英、坪井敬文、朝日博子、太田伸生、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* におけるオートファジー関連遺伝子の機能解析:第20回日本生体防御学会学術総会 2009年7月 東京
- Kwansa-Bentum, B., Asahi, H., Kitamura, K., William K.A., Kumagai, T., Izumiyama, S. and Ohta, N.: Comparative study of *Plasmodium falciparum* growth in three different serum-free media after exposing parasite to chloroquine or artemisinin. 第50回日本熱帯医学会大会総会, 2009年10月、沖縄、
- 桑原奈々、杉原徳彦、宮下 勉、金谷光恵、山崎 浩、朝日博子、上野正純、福富裕之、杉原壽彦、プラジカンテルを用いた駆虫で頭節を回収し得た無鉤条虫症の一例、日本衛生検査所協会学術研究発表会 2009年11月、東京
- Asahi, H., Izumiyama, S., Kwansa-Bentum, B. and Tolba, M.E.: Identification of components of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* that interact with growth-promoting lipids. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th

Annual Meeting, in Washington, DC, USA, November 2009
 Kwansa-Bentum, B., Kitamura, K., William K.A., Kumagai, T., Izumiyama, S., Asahi, H., Wilson, M.D. and Ohta, N.: Comparative study of Plasmodium falciparum growth in serum-free media and expression levels of PfCRT gene after exposure to drug. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th Annual Meeting, in Washington, DC, USA, November 2009.

山崎 浩, 川中正憲, 荒川京子, 森有加, 杉山広, 森嶋康之, Ruben Mercado, 加藤基恵. 南米チリより DNA 鑑別依頼のあった裂頭条虫について. 第 20 回日本臨床寄生虫学会 2009 年 6 月 20 日、大阪.

山崎浩, 森有加, 杉山広, 森嶋康之, 川中正憲. 病理組織標本中に検出された寄生蠕虫の DNA 鑑別診断について. 第 69 回日本寄生虫学会東日本支部大会、2009 年 10 月 3 日、東京.

桑原奈々, 杉原徳彦, 宮下勉, 金谷光恵, 山崎 浩, 朝日博子, 上野 正純, 福富裕之, 杉原壽彦. プラジカンテルを用いた駆虫で頭節を回収した得た無鉤条虫の一例. 日本衛生検査所協会学術研究発表会、2009 年 11 月 26 日、東京.

梅原 梓里, 杉山 広, 森嶋康之, 山崎浩, 荒木 潤, 川上 泰, 黄 鴻堅, 内田明彦. 台湾でタチウオから検出されたアニサキス幼虫の分子同定. 第 78 回日本寄生虫学

会大会, 東京, 2009 年 3 月.

梅原 梓里, 荒木 潤, 川上 泰 3 人
 田 明彦, 杉山 広. アニサキスの分類学的解析: 人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索. 第 147 回日本獣医学会学術集会, 宇都宮, 2009 年 4 月.

杉山 広. 食習慣を背景に発生する我が国の肺吸虫症. 第 20 回日本臨床寄生虫学会, 吹田, 2009 年 6 月.

寺島 剛, 竹内英二, 西尾久明, 石川将史, 山本徳栄, 荒木 潤, 杉山広. 肺切除で宮崎肺吸虫の虫嚢内寄生を認めた 1 例. 第 20 回日本臨床寄生虫学会, 吹田, 2009 年 6 月.

杉山 広, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎浩. 食品媒介寄生蠕虫症: アニサキス症・肺吸虫症を例として. 第 30 回衛生微生物技術協議会総会・研究会, 堺, 2009 年 7 月.

Sugiyama, H. and Rangsiruji, A. How many kinds of Paragonimus westermani are there? The 6th seminar on food- and water-borne parasitic zoonoses, Bangkok, December, 2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

善本知広, 中西憲司 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.
 出願日: 2009.10.26 国際出願
 番号: PCT/JP2009/005625

2. 実用新案登録

該当せず

3. その他

該当せず

Ⅱ. 分担研究報告書

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

赤痢アメーバの病原性遺伝子の同定と病原機構の解明

研究代表者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 赤痢アメーバ症は世界人口の約1%が感染し、毎年約11万人が死に至る重要な腸管寄生性原虫症である。特にアジア等の開発途上国を中心として蔓延するが、その医学的重要性にも関わらず十分な社会的注目を得られていない「顧みられない病気(Neglected tropical disease)」である。本研究では、トランスクリプトーム解析等の"omics"解析により、病原性や細胞分化等に関連する遺伝子を同定し、その機能を解明することによって、赤痢アメーバ症の生物学・病原学の理解を進め、新しい予防・治療法の創出につなげることを目的としている。本年度は、初年度までの研究で発見された病原性に相関する遺伝子に関して、病原機構における役割の解析を行った。また、初年度作製された *E. histolytica*/*E. invadens* ハイブリッド発現解析用 DNA マイクロアレイを用いて、嚢子化過程の経時的発現プロファイリングを行い、感染に必須な栄養型から嚢子への分化に関わる遺伝子群を明らかにした。以上、次年度の研究目的はほぼ計画通りに達成された。

A. 研究目的

アメーバ赤痢（赤痢アメーバ症）は熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心として世界の1%が感染する重要な腸管原虫症である。世界中で年間約10万人が感染によって死亡し、単細胞性原生生物の中で、マラリアに次ぎ感染死者数の多い感染症である。赤痢アメーバ症の流行は開発途上国に限定されず、我が国を含む一部先進諸国において、深刻な社会問題となっている。特に本邦においては、長期滞在型障害者施設に居住する知的障害者やグループホーム等に通う障害者、更に、男性同性愛者(Men who have sex with men, MSM)において慢性的な高い感染率を示している。また、前者では時にアウトブレイクが報告され、精神衛生行政において重要な関心事となっている。

赤痢アメーバ症は、主として、特にアジア等の開発途上国を中心として蔓延するが、その医学的重要性にも関わらず十分な社会的注目を得られていない「顧みられない病気(Neglected tropical disease)」である。一方で、

本邦における感染状況に鑑み、厚生行政上の具体的な危機となり得る。

赤痢アメーバの研究は2005年の全ゲノムの解読によりポストゲノム時代に入り、それに即応した研究手法が不可欠である。ゲノミクスにより全遺伝子情報が明らかになった今、病原性・代謝・分化・寄生といった重要な生物学の解明には、統合的な"omics"手法を端緒とした研究手法が極めて有効である。本研究では、病原性遺伝子を発見し、更に、それぞれの病原性因子の機能を詳細にマップし、病原機構の網羅的解明を行う研究を目的としている。次年度は、初年度までの研究成果として同定された病原性相関遺伝子に関して、その局在と機能解析を行った。また、初年度作製を終えた発現解析用 DNA マイクロアレイを用いて、嚢子化過程の経時的発現プロファイリングを行い、感染に必須な栄養型から嚢子への分化に関わるの遺伝子群を明らかにした。

B. 研究方法

1. 赤痢アメーバ病原遺伝子の局在の解析

高い病原性を有する赤痢アメーバ L-HM1 株と病原性を減弱させた低病原株 A-HM1 の発現解析により、発現量が L-HM1 株で高度に上昇していた遺伝子 ArfA2 局在を解析するために、N 末端に HA エピトープを付加した ArfA2 を発現する形質転換体を作成するのに使用するプラスミドを作成した。ベクターとして pEhEX-HA (Nakada-Tsukui Cell Microbiol 2009) を用いた。赤痢アメーバ栄養型の形質転換体の作成は常法に従った (Nozaki J Biol Chem 1999)。間接蛍光抗体法による細胞の固定、局在の観察等は常法 (Satio-Nakano J Biol Chem 2004) に従った。

2. ArfA2 を含めた Arf アイソタイプの遺伝子の多様性と発現の解析

赤痢アメーバは全ゲノム中から Arf 遺伝子群を同定した。同定には blast p を用いた。得られたタンパク質は ClustalW によりアラインメントを作成した後、Neighbor joining 法により系統解析を行った。更に、定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) 法により、A-HM1, L-HM1 から得られた mRNA を用いてそれぞれの Arf アイソタイプの発現を確認した。qRT-PCR 法は常法に従った (Saito-Nakano Cell Microbiol 2007)。

3. ArfA2 の機能解析

ArfA2 のグアニンヌクレオチド結合部位のアミノ酸置換により GTP 或は GDP 結合型の変異体を作成した。方法は常法 (Saito-Nakano J Biol Chem 2004) に従った。変異型 ArfA2 は上記の pEhEX-HA に導入後、形質転換体を作成した。これら HA-ArfA2-GTP、HA-ArfA2-GDP、HA-ArfA2-野生型、及びコントロール形質転換体を用いて以下の比較を行った。第一に局在の変化を上記の方法

に従い、更に細胞分画とイムノプロットにより解析した。第二に、リソソームの数と形態をリソトラッカーによりラベルした栄養型を用いた、共焦点顕微鏡観察により計測した。

4. 嚢子化のトランスクリプトーム解析

初年度に作成された全 9230 の *E. histolytica* 特異的プローブセットと 12385 の *E. invadens* 特異的プローブセットを搭載した Affymetrix 社製の 11 ミクロンの 49-7875 を用いたプラットフォームを用いて発現解析を行った。RNA の抽出、cRNA の作成、ハイブリダイゼーションなどプロトコルは常法に従った (Gilchrist Mol Biochem Parasitol 2006)。得られた強度データは ANOVA により解析された。*E. invadens* の培養並びに嚢子化は常法に従った (Picazarri Inf Immunol. 2008)。

(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. Arf 遺伝子のインシリコ解析

赤痢アメーバのゲノムには 8 種類の Arf GTPase が存在した。これらを系統樹解析したところ、大きく A-C の 3 群に分けられた (図 1)。更に、ヒトの Arf との同一性の高い順番に番号付けを行った。系統樹解析による分類と保存部位のアミノ酸の多型とは良く相関していた。本研究の L-HM1 と A-HM1 の発現比較により得られたタンパク質は ArfA2 と命名された。ArfA2 はヒト及び酵母の特定の Arf アイソタイプに際立って高い同一性を示さず、その局在と機能はインシリコでは予測できなかった。

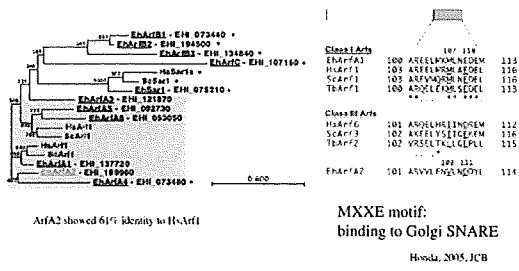


図1 赤痢アメーバにおける Arf アイソタイプの系統樹解析 (左)、及び、他種生物との比較 (右)

2. Arf アイソタイプ遺伝子の発現解析

DNA マイクロアレイにより示唆された L-HM1 と A-HM1 の ArfA2 特異的な発現量の差異について qRT-PCR による確認を行った。図2に示すように、ArfA2 の発現は約 20 倍 L-HM1 株で上昇していた。ArfA2 以外に関しては発現量の際は認められなかった。

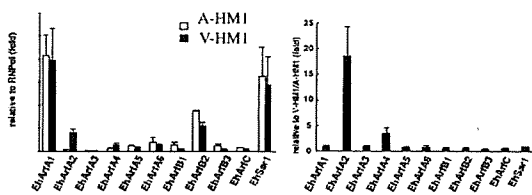


図2 Arf アイソタイプ遺伝子の定常的 mRNA の定量解析 A-HM1 (白棒) と L-HM1 (黒棒) における発現の絶対量 (左)、及び L-HM1 における発現上昇の程度 (右) を示す。

3. ArfA2 の細胞内局在

HA 標識を付加した ArfA2 の赤痢アメーバ栄養型における局在を調べた。間接蛍光抗体法により ArfA2 はその大部分が細胞質に、或は細胞質内に無

数に存在する小胞に存在することが示唆された。細胞分画と免疫プロットの結果は大部分が細胞質内に、少量が膜に局在することを示唆した。GTP 型変異体では膜局在の割合が上昇した。

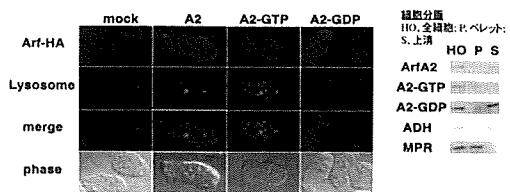


図3 ArfA2 の赤痢アメーバ栄養型における局在 間接蛍光抗体法による顕微鏡像 (左) と細胞分画後の免疫プロットの結果 (右) を示す。

4. ArfA2 の発現による形質の変化

ArfA2-GTP の発現は細胞内のリソソームを上昇させるとともに、リソソームの径を上昇させた。逆に ArfA2-GDP の発現は逆の効果を生んだ。

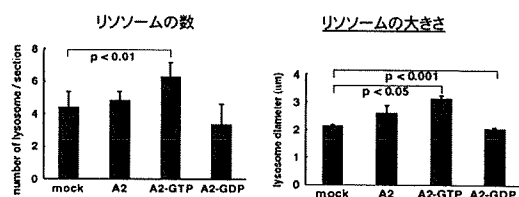


図4 コントロール(mock)、ArfA2 野生型、GTP 型、GDP 型変異体の発現株におけるリソソーム数とリソソーム径の比較

更に、ArfA2 の高い発現レベルとリソソームの形成の亢進が L-HM1 において「同時に」起こっていることを A-HM1 との比較により確認した (図

5)。

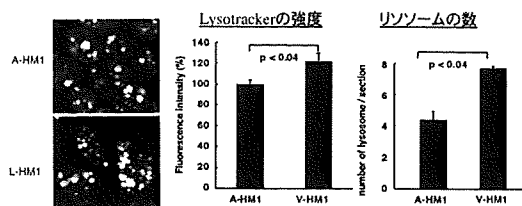


図5 A-HM1 とL-HM1 におけるリソソーム特異的染色の強度 (中) とリソソーム数 (右) の比較 染色像を左に示す

5. 嚢子化におけるトランスクリプトームの経時的变化

嚢子化は培地のグルコースの除去とグルコース以外の全成分の濃度を約 1/2 にすることにより誘導された。形態的变化は 24 時間後から始まり、48 時間後に 40%、72 時間後に 60%、120 時間後に 80% に達した。

全プローブセットのうち、約 2000 の遺伝子が少なくとも 1 点以上で 3 倍以上の上昇を示した。0, 0.5, 2, 8, 24, 48, 120 時間における全遺伝子発現を主成分解析 (PCA 解析) すると、図 6 に示すように、0-8 時間の各点に高い相似が見られたのに対して、その後の各点では極めて高度の遺伝子発現パターンの変化が起こっていることが示された。

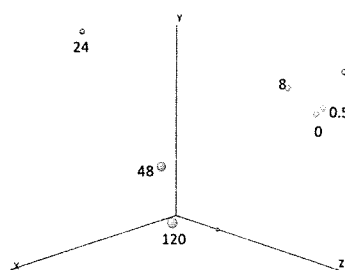


図 6 嚢子化における各時系列での遺伝子発現の PCA 解析

全嚢子過程を仮に 0.5-2 時間、8-24 時間、48-120 時間と分けて変動した遺伝子数を閾値を振って調べた結果を図 7 に示す。

Category	Time	Regulation vs time 0	Fold change cut off value	Number of genes
I. Early stage of encystation	0.5 and 2 hours	UP	a > 3 fold	53 genes*
			b > 5 fold	34 genes*
II. Intermediate	8 and 24 hours	UP	a > 3 fold	155 genes*
			b > 5 fold	92 genes*
III. Final stage of encystation	48 and 120 hrs	UP	a > 3 fold	1,110 genes
			b > 5 fold	616 genes
			c > 10 fold	222 genes
			d > 15 fold	187 genes
			e > 20 fold	137 genes*

図 7 嚢子化誘導後 0.5-2、8-24、48-120 時間において変動した遺伝子数

その中で特徴的な動態を示す 3 群を図 8-10 に示す。

I. Early stage of encystation (0.5 and 2 hours)

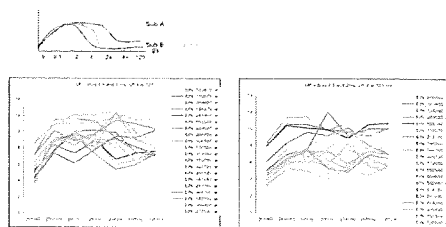


図 8 嚢子化初期(0.5-2 時間)で誘導される遺伝子群の発現動態

II. Intermediate stage of encystation

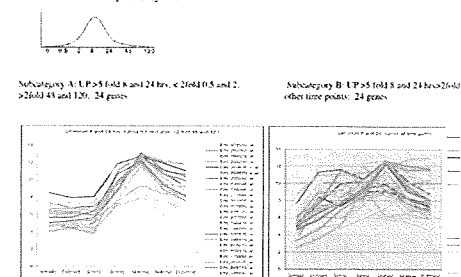


図 9 嚢子化中期(8-24 時間)で誘導される遺伝子群の発現動態

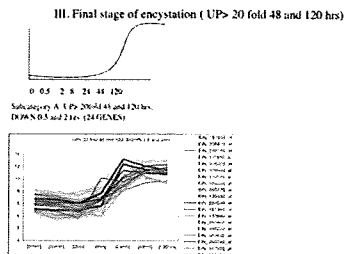


図 10 嚢子化後期(48-120 時間)で誘導される遺伝子群の発現動態

gene family を形成する遺伝子群の中でも、アイソタイプにより発現プロファイルの異なるものが多い。その例を図 11 に示す。

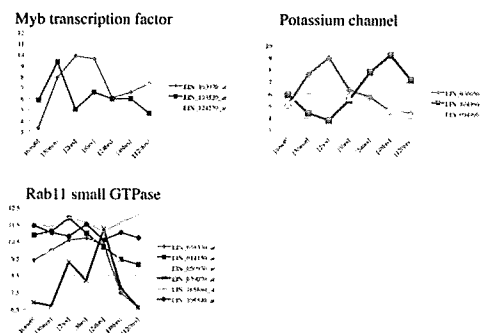


図 11 アイソタイプ間で異なった時依存的(time-dependent)発現パターンを示す遺伝子ファミリー

D. 考察

本研究は、ゲノム情報が存在する寄生性原生生物由来感染症を対象として、ポストゲノムの手法を用いて、その病原性・代謝・細胞分化などの重要な生物学の特性を明らかにすることを目的としている。具体的には、病原性の異なる腸管原虫赤痢アメーバの株間で遺伝子発現プロファイルを比較することにより、病原性に強く相関する遺伝子を抽出し、その機能を逆遺伝学的手法により確認することを柱のひとつとした。同時に、赤痢アメーバ症のヒト-ヒト感染において重要

な過程である細胞分化(嚢子化)の分子メカニズムを詳細に明らかにすることを旨として、嚢子化過程でのトランスクリプトームを明らかにしようとしている。2年時は、これまでの研究により病原機構への関与が強く示唆された遺伝子に着目し、その機能の解明を試みた。

我々が同定した ArfA2 は病原株において、非病原株と比較して約 20 倍の高い遺伝子発現を示した。逆遺伝学的手法により、ArfA2 がリソソームの成立と成熟に重要な役割を果たすことが示唆された。ArfA2 の野生型或は活性型(GTP 型)の過剰発現により、病原株と同様にリソソームの数と大きさが上昇することが証明された。リソソーム酵素・タンパク質の多くが病原機構に関与することが指摘されており、ArfA2 の増加或は活性化によってリソソームのシステインプロテアーゼ・アマーバポアなどの活性が上昇するか、或はリソソームへの又はリソソームからの輸送が亢進したことが原因と考えられた。これらの可能性に関しては最終年度以降解明する予定である。

また、初年度に作成された *E. histolytica*/*E. invadens* ハイブリッド DNA マイクロアレイを用いた嚢子化過程のトランスクリプトーム解析では、全体の 1/6-1/5 の遺伝子が嚢子化過程の測定された 6 点のうち少なくとも 1 点以上で 3 倍以上の発現上昇を示した。クラスター解析により、これらの変動遺伝子はいくつかの明瞭に異なるパターンに分けられた。この基盤的な成果により、嚢子化過程におけるそれぞれのタイミングで発現される遺伝子群が特定された。以上の成果は、最終年度以降に目的としている嚢子化のマスター遺伝子の特定、嚢子化シグナルセンサーの特定、嚢子化特異的輸送経路・プロテアーゼの特定などの目標に関して、具体的な候補遺伝子を与えるのに充分であった。

E. 結論

2年度の研究は、研究計画に従って進められ、十分な成果を得た。特定された病原性関連因子 ArfA2 のリソソーム生合成における機能が解明され、膜輸送が病原機構に重要な役割を果たすことが改めて確認された。また、嚢子化過程の遺伝子発現調節を時系列に従い詳細に解明し、トランスクリプトームのほぼ全容が解明された。最終年度以降の研究計画の遂行により、赤痢アメーバにおける病原・代謝・分化等に関するこれまで未解明であった多くの重要な分子機構が解明されると期待される。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- Hussain, S., Ali, V., Jeelani, G., and Nozaki, T. (2009) Isoform-dependent feedback regulation of serine O-acetyltransferase isoenzymes involved in L-cysteine biosynthesis of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 163, 39-47.
- Nakada-Tsukui, K., Okada, H., Mitra, B. N., and Nozaki, T. (2009) Phosphatidylinositol-phosphatases mediate cytoskeletal reorganization during phagocytosis via a unique modular protein consisting of RhoGEF/DH and FYVE domains in the parasitic protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.* 11, 1471-1491.
- Sato, D. and Nozaki, T. (2009) Methionine gamma-lyase: the unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life*, 61, 1019-1028.
- Mi-ichi, F., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009) Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 21731-21736.
- Sato, D., Kobayashi, S., Yasui, H., Shibata, N., Toru, T., Yamamoto, M., Tokoro, G., Ali, V., Soga, T., Takeuchi, T., Suematsu, M., and Nozaki, T. (2010) Cytotoxic effect of amide derivatives of trifluoromethionine to the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 35, 56-61.
- Escueta-de Cadiz, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Tachibana, H., and Nozaki, T. (2010) Identification of an avirulent *Entamoeba histolytica* strain with unique tRNA-linked short tandem repeat markers. *Parasitol. Int.* 59, 75-81.
- Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. (2010) Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulphur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cell. Microbiol.* 12, 331-342.
- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Ali, V., and Nozaki, T. (2010) Characterization of two isotypes of L-threonine dehydratase from *Entamoeba*

- histolytica. Mol. Biochem. Parasitol. 170, 100-104.
- 津久井久美子、野崎智義 (2009) 腸管寄生性原虫の小胞輸送—病原機構における役割 実験医学 27, 1548-1556.
- Chung Chau Hon, Kumiko Nakada-Tsukui, Tomoyoshi Nozaki and Nancy Guillén (2010) Dissecting the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica* from a Genomic Perspective. In "Anaerobic Parasitic Protozoa: Genomics and Molecular Biology" Edited by C. Graham Clark, Patricia J. Johnson and Rodney D. Adam. Caister Academic Press, ISBN: 978-1-904455-61-5, March 2010.
2. 学会発表
- 野崎智義 赤痢アメーバ症新規創薬 第147回日本獣医学会学術集会 宇都宮、April 2-4, 2009. (シンポジウム招待講演)
- 野崎智義 寄生虫と感染症 知の市場 早稲田大学、東京、June 30, 2009
- 古川敦、津久井久美子、野崎智義 システインプロテアーゼ輸送体の機能解析 第17回分子寄生虫ワークショップ 草津 August 6-9, 2009.
- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Biochemical and physiological function of a novel reductase from the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.
- Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Mi-ichi, F., Soga, T., Suematsu, M., Ali, V., and Nozaki, T. Metabolomic and transcriptomic analysis of sulfur-containing amino acid metabolism in enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, September 8-11, 2009.
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., Yamada, Y., and Nozaki, T. Functional analysis of a putative cysteine protease receptor from *Entamoeba histolytica*. The XXth Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, Sept 13-17, 2009.
- Nozaki, T. Rab small GTPases and phosphatidylinositides regulate phagocytosis and membrane trafficking of virulence factors: their roles in the pathogenesis of amebiasis. XVIIIth Congress of Parasitology, Aguascalientes, Mexico, September 21-26, 2009.
- 津久井久美子、野崎智義 イノシトールリン脂質シグナルを介した赤痢アメーバ貪食制御機構 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 大阪、October 9-10, 2009.
- 見市文香、野崎智義 ミトコンドリア関連オルガネラの新規機能—赤痢アメーバ原虫"sulfosome"に存在する硫酸活性化経路—第82回日本生化学会大会 神戸、October 21-24, 2009.
- 岡田麻美、見市文香、Nirianne Marie Q. Palacpac、野崎智義、狩野繁之、三田村俊秀 赤血球期熱帯熱マラリア原虫の脂質滴の生合成と輸送 第82回日本生化学会大会

神戸、October 21-24, 2009.
津久井久美子、Aleyla Escueta、中野
由美子、野崎智義 赤痢アメーバ
等における小胞輸送の多様性と
進化 第82回日本生化学会大会
神戸、October 21-24, 2009.
唐木剛、村野祥子、亀井加恵子、佐藤
暖、野崎智義、原田繁春
Entamoeba histolytica 由来メチ
オニンガンマリアーゼ1と2のX

線結晶構造解析 第82回日本生
化学会大会 神戸、October
21-24, 2009.

H. 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(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

顧みられない病気に関する研究

研究分担者 濱野 真二郎 長崎大学・熱帯医学研究所

研究要旨 赤痢アメーバ症は発展途上国における小児下痢症の主要原因である。我々は赤痢アメーバの感染モデル系を確立し同原虫の感染成立、病原性発現機構ならびに同原虫に対する感染防御機構の研究を展開している。本研究の目的は宿主が赤痢アメーバを認識するメカニズムを解明し、さらにはその認識が感染病態や防御に果たす役割を個体レベルで明らかにすることにある。昨年度までの研究より、赤痢アメーバ認識のシグナルが MyD88 依存性に伝達されることが明らかとなった。本年度は炎症性サイトカインの産生誘導能と病原性の関連が示された。すなわち、病原性 *Entamoeba histolytica* では IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインの産生が誘導されたが、非病原性アメーバ *E. dispar* では誘導されなかった。一方、*E. moshkovskii* でも炎症性サイトカインの産生が誘導され、*E. moshkovskii* にも PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) が存在することが示唆された。*E. moshkovskii* 認識時の炎症性サイトカインの産生パターンは、IL-6 の産生が極端に低く TNF- α 優位のサイトカイン産生が認められるなど、*E. histolytica* 認識時とは異なり、*E. moshkovskii* における PAMPs の組成が *E. histolytica* とは明らかに異なることが示唆された。

A. 研究目的

我々は赤痢アメーバの感染モデル系を確立し同原虫の感染成立、病原性発現機構ならびに同原虫に対する感染防御機構の研究を展開している。これまでの研究から、CBA/J や C3H/HeJ、C3H/HeN など一部の系統では過半数以上のマウスで感染が成立しヒト同様の病理像が認められる一方で、C57BL/6 や BALB/c マウスなど、その他多くの系統のマウスでは原虫が腸管に定着できず感染が成立しないことを見出してきた。また両系統間の差異は主として腸管上皮細胞やムチン・腸内

細菌叢などの非骨髄細胞分画の違いに起因することを明らかにしており、その差異を規定する因子に関しては遺伝学的・生化学的なアプローチを続けている。

赤痢アメーバの腸管内定着や上皮細胞への接着・貪食には Gal/GalNAc を認識・結合するレクチンが重要であることが知られている。昨年度は、1) 赤痢アメーバのレクチンのリガンドである Gal/GalNAc の腸上皮での発現に両系統間で差がないことを示し、また 2) 150 余りの染色体マーカーを用いた連鎖解析から、赤痢アメーバの腸管内定着を阻害する因子がマウスの第1および2染色体上にコードされて

いることを示した。さらに 3)原虫が定着すると、肉眼的にも観察できるほどの著しい腸壁の肥厚が認められ、好中球を始めとした顆粒球や単核球の浸潤を伴う激しい炎症が惹起された。顆粒球を生体内から除去するとマウスの感染率が 60% から 90% へ上昇したことより、これら innate immunity は宿主にとって防御的に働くと考えられた。4)赤痢アメーバの認識が TLRに依存するかどうかを調べる目的で、野生型もしくは MyD88 遺伝子欠損マウスからマクロファージや樹状細胞を単離して赤痢アメーバにて刺激したところ、赤痢アメーバの認識シグナルが MyD88 依存性に伝達されることが判明した。

本年度は病原性アメーバと非病原性アメーバの炎症性サイトカインの発現誘導能を比較検討し、また *Entamoeba moshkovskii* の病原性に関して考察を深めた。

B. 研究方法

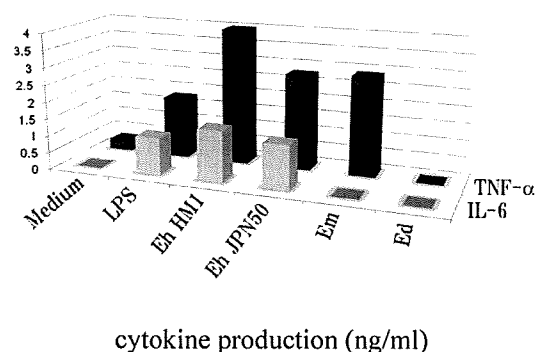
野生型の腹腔マクロファージを単離し、10%ホルマリンで固定した各種赤痢アメーバ原虫 (*E. histolytica*, *E. moshkovskii*, *E. dispar*) と共に培養して上清中に産生される炎症性サイトカインを ELISA で測定した。また、*E. moshkovskii* のマウス腸管への定着能を調べた。さらに次年度以降の in vivo の研究に備えて、各種遺伝子欠損マウスのCBA/Jバックグラウンドへの戻し交配を進めた。

(倫理面への配慮)

実験動物へ与える苦痛が最小限となるように努めた。

C. 研究結果

病原性 *Entamoeba histolytica* では IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインの産生が誘導されるのに対して、非病原性アメーバ *E. dispar* では誘導されなかった。一方、*E. moshkovskii*でも炎症性サイトカインの産生が誘導されたが、その産生パターンは、IL-6 の産生が極端に低く TNF- α 優位のサイトカイン産生が認められるなど、*E. histolytica* 認識時とは異なった。



上述の3種のアメーバの定着能を調べたところ、非病原性アメーバ *E. dispar* はマウス腸管内に定着できなかったが、*E. moshkovskii* がCBA/J マウス腸管に一定期間定着・感染し、消化管症状を引き起こすことが判明した。

D. 考察

*E. moshkovskii*でも炎症性サイトカインの産生が誘導され、*E. moshkovskii* における PAMPs の存在が示唆された。ただし、炎症性サイトカインの産生パターンが *E. histolytica* 認識時とは異なることより、*E. moshkovskii* における PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) の組成は *E. histolytica* とは明らかに異なることが示唆された。細胞外寄生性原虫である赤痢アメーバの PAMPs の

認識には MyD88 依存性のシグナルが重要であり、MyD88 の上流では Toll like receptors (TLRs) が機能していることが予測される。次年度以降は、1) 認識される赤痢アメーバの Pathogen associated molecular patterns (PAMPs) と TLRs の同定、ならびに 2) そのシグナルが赤痢アメーバに対する感染防御に果たす役割を明らかにする。

E. 結論

1) *E. histolytica*, *E. moshkovskii* の表面に存在する PAMPs は免疫系に認識される。2) 炎症性サイトカインの産生パターンから両種の PAMPs の構成は異なることが示唆された。3) *E. moshkovskii* はマウス腸管に定着できることが見出された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Buss, S.N., Hamano, S., Vidrich, A., Evans, C., Zhang, Y., Crasta, O.R., Sobral, B.W., Gilchrist, C.A., Petri, W.A. Jr. : Members of the *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase family play non-redundant roles in growth and phagocytosis. **Int J Parasitol.** 2010.
- ② Watanabe, K., Kishihara, K., Hamano, S., Koga, M., Nomoto, K., Tada, I.: *Strongyloides ratti*: implication of mast cell-mediated expulsion through FcεRI-independent mechanisms. **Parasite.** 2009; 16(3): 209-214.
- ③ Tetsutani, K., Ishiwata, K., Ishida, H., Tu,

L., Torii, M., Hamano, S., Himeno, K., Hisaeda, H. : Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice. **Eur J Immunol.** 2009; 39(10): 2822-2830.

2. 教科書、一般書執筆

- ① Hamano, S. and William A. Petri Jr.: Chapter 209: Amoebiasis in “Feigin, Cherry, Demmler, Kaplan: Textbook of Pediatric Infectious Disease, 6th edition” Elsevier, London, in press.
- ② 吉田裕樹・濱野真二郎: 原虫感染とIL-12 サイトカインファミリー、蛋白質核酸酵素、2009; 54(8):1059-1065
- ③ 小林隆志・川澄みゆり・濱野真二郎: 感染症制御における制御性T細胞、アレルギー・免疫、2009; 16(5): 708-714.

3. 学会発表

- ① 第78回日本寄生虫学会
Shinjiro Hamano, Becker Stephen, Asgharpour Amon, Ocasio Yina P. R., Stroup Suzanne E., Mc Duffie Marcia, Houpt Eric: 赤痢アメーバの感染成立を規定する宿主因子に関する研究
- ② 第9回あわじしま感染症免疫フォーラム
Yoshinori Mitsui, Mitsumasa Miura, Yoshiki Aoki, Shinjiro Hamano: In vitro effects of artesunate on the survival of worm pairs and egg production of *Schistosoma mansoni*.

③ 第3回蠕虫研究会

三井義則、三浦光政、青木克己、濱野真二郎、マンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) の成虫の生存期間及び虫卵の生産に与えるアルテスネイトのインビトロでの効果

④ 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム

濱野真二郎、下川周子、Haque Rashidul、Mondal Dinesh、カラ・アザールの発症を規定する内部環境因子に関する研究

⑤ The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases

Shinjiro Hamano: Genetic control of resistance to intestinalamebiasis in inbred mice.

⑥ 第3回GCOEワークショップ

濱野真二郎：赤痢アメーバ症ならびにリーシュマニア症の研究 ～病原性発現機構ならびに感染防御機構の解明～

⑦ 原虫感染免疫研究会

下川周子、千馬正敬、石渡賢治、小林正規、濱野真二郎： Intestinal helminthic infection enables *Entamoeba histolytica* to settle in mice.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

熱帯熱マラリア原虫の脂質代謝・輸送の分子機構の解明

研究分担者 三田村俊秀 国立国際医療センター研究所 室長

研究要旨： マラリアの治療戦略につなげることを念頭に、臨床症状・病理の主因である赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖を支える脂質代謝の分子基盤に関する研究を継続している。これまでに明らかにしてきた結果から、私たちは赤血球期原虫の増殖において、血清中脂肪酸のオレイン酸は欠くことのできない因子であると推定している。本研究では、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酵素であるステアリン酸-CoA 不飽和化酵素の赤血球期原虫の増殖における役割を明らかにするために、ノックアウト原虫の作成と解析を行った。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ノックアウトコンストラクトを用いて、複数のノックアウトクローン候補株を取得した。それらについて、gDNA を用いた PCR、total RNA を用いた RT-PCR、さらには ^{14}C -ステアリン酸を用いた代謝ラベル実験などをおこなった。結果、ステアリン酸-CoA 不飽和化酵素候補遺伝子の破壊により、その転写産物が消失し、さらにはステアリン酸からオレイン酸を産生する活性が消失しているクローン株が 2 株確立できた。ノックアウトクローン株とそれらの親株について、複数の血清培地、ならびに無血清培地における細胞増殖レベルを比較したところ、増殖率に有意な差は見出されなかった。しかし、幾つかの培地において、96 時間後のステージの分布に有意な差がみられた。これらは、ステアリン酸-CoA 不飽和化酵素遺伝子の破壊は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞周期進行に何らかの影響を与えていることを示唆している。

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、このステージの原虫の増殖を押さえることが、有効な予防・治療戦略となりえる。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、その分子基盤について、ヒトのそれらとの差異を明確化することを念頭に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の細胞増殖に必須な血清中因子は脂肪酸であり、パルミチン酸 ($\text{C}_{16:0}$ 、飽和脂肪酸) とオレイン酸 ($\text{C}_{18:1, n-9}$ 、不飽和脂肪酸) の組み合わせ、もしくはステアリン酸 ($\text{C}_{18:0}$ 、飽和脂肪酸) が key molecule であること。(2) 赤血球期の原虫は、必須脂肪酸を血中からの取り込みに完全に依存しているが、key molecule であ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が常に検出できること。(3) パルミチン酸とオレイン酸のみを含む無血清培地において、原虫の赤血球サイクルを良好に維持するためには、パルミチン酸のパートナーは、オレイン酸である必要があり、炭素鎖長が同じ 18 であるが不飽和結合

の位置とその数がそれぞれ異なるバクセン酸 ($\text{C}_{18:1, n-7}$) やリノール酸 ($\text{C}_{18:2, n-6}$) では代替できないことを明らかにしてきた。これらの結果からオレイン酸は、欠くことのできない血清中因子の一つであると推定している。

本分担課題においては、ステアリン酸からオレイン酸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-CoA 不飽和化酵素 (stearyl-CoA desaturase) のノックアウト原虫株の作成とその解析を行った。

B. 研究方法

1. プラスミド構築とトランスフェクション
PFE0555w ORF 中の N-末端側をコードするエクソン部分の約 1010 bp を熱帯熱マラリア原虫 Honduras-1 株の gDNA より PCR により増幅、塩基配列の確認後、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 ベクターに組み込んだ (pHDWT-PfDes9-N2)。作成したプラスミドをエレクトロポレーション法により、Honduras-1 株に導入し、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、もう一度選択