

-非選択サイクルを繰り返し、選択下で増殖できる培養株を得た。得られた培養株を限外希釈法によるクローニングを行い、24 個のクローン株を取得した。なお、最初の非選択下での培養から、通常の培養条件に加えて、60 μ M のオレイン酸を結合させたウシ血清アルブミンを添加して行った。

培養株、クローン株におけるコンストラクトのゲノムへの挿入、そしてそれに伴う PFE0555w ORF の転写産物の消失については、各種のプライマーセットを用いた PCR、ならびに RT-PCR により確認した。

得られたクローンの中から 2 つを選び、先行論文 (*Parasitology* 133, 399-410, 2006) に示す方法により、各種細胞におけるステアリン酸からオレイン酸の産生能を確認した。

親株、ノックアウト株それぞれを、スタンダードな血清培地、これに 60 μ M のオレイン酸を結合させたウシ血清アルブミンに添加した培地、または各種脂肪酸を結合させたウシ血清アルブミンを添加した無血清培地にて培養し、細胞増殖に与える影響を赤血球期が 2 サイクルしたことに相当する 96 時間後の増殖率により比較検討した。

(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

stearyl-CoA desaturase の遺伝子構造を明らかにするために、マラリアゲノム情報のデータベース PlasmoDB (<http://www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp>) 上に推定 stearyl-CoA desaturase 遺伝子としてアノテートされている PFE0555w について、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を行った。結果、197 bp の 5' -UTR と 2,850 bp の ORF、さらにそれに続く 90 bp の 3' -UTR を含む cDNA の存在が推定された。ここでこの cDNA をコードする遺伝子を *PfDes9* と命名した。

確認した *PfDes9* 遺伝子構造を基にノックアウトコンストラクト pHDWT-PfDes9-N2 を構築した。コンストラクトを原虫に導入後、薬剤 WR99210 による選択-非選択-選択というステップと限外希釈法により、最終的に合計 24 個のクローン株を樹立した。そのうち 22 個のクローンにおいては、gDNA を用いた PCR とそれに続く PCR 産物の塩基配列決定により、ゲ

ノム上の *PfDes9* 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確認できたことから、*PfDes9* 遺伝子の破壊が起こった株が樹立できたと考えられる。

PfDes9 転写産物の有無を確認するために、親株、そして 2 つのノックアウトクローン株から total RNA を調整し、RT-PCR とそれに続く PCR 産物の塩基配列決定を行った。結果、ノックアウトクローン株は、双方とも *PfDes9* 転写産物からの増幅産物が確認できなかった。したがって、*PfDes9* 遺伝子の破壊により、その転写産物が消失したと推定される。

ステアリン酸からオレイン酸の産生能の有無を確認するために、親株と 2 つのノックアウトクローン株を 14 C-ステアリン酸により代謝ラベルし、その後全脂質中に存在する 14 C-オレイン酸を TLC により検出した。結果、親株で見られる 14 C-オレイン酸のシグナルは、2 つのノックアウトクローン株においては検出できなかった。PlasmoDB 上で *PfDes9* は他種生物由来の stearyl-CoA desaturase の原虫オルソログと推定されていることを考え合わせると、*PfDes9* は熱帯熱マラリア原虫 stearyl-CoA desaturase の本体であると推定でき、ゲノムと転写産物の解析、さらには活性測定の結果を総合して考えると、熱帯熱マラリア原虫 stearyl-CoA desaturase 遺伝子破壊株が樹立できたと結論できる。

PfDes9 遺伝子破壊が赤血球期原虫の細胞増殖にどのように影響するかを調べるために、親株と 2 つのノックアウトクローン株を各種の血清、無血清培地における細胞増殖率を比較した。結果、調べた全ての培地において、親株とノックアウトクローン株との間に有意な差は見られなかった。しかしながら、96 時間後の各ステージの分布を比較した場合、幾つかの培養条件において、親株とクローン株との間で有意な差がみられた。これは、*PfDes9* 遺伝子破壊が細胞周期の進行に影響を与えていることを示唆しており、*PfDes9* 遺伝子産物である stearyl-CoA desaturase により産生されるオレイン酸が、ある条件においては細胞増殖に必須であることを考え併せると非常に興味深い知見である。

現在は、赤血球期以外のステージである蚊の体内での細胞増殖、さらには肝細胞中での細胞増殖などについて、*PfDes9* の *Plasmodium berghei* オルソログを破壊した原虫を作成し、マウス-ハマダラ蚊の感染系を利用して、マラリア原虫の全生活環中での影響が表れるステージの解析を進行させている。

E. 結論

熱帯熱マラリア原虫 stearyl-CoA desaturase の本体をコードする遺伝子を同定し、その遺伝子破壊株を取得することに成功した。調べた限りの培養条件においては、本遺伝子の破壊は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の細胞増殖に影響を与えなかった。

F. 健康危険情報（省略）

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 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.

2) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究報告書

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

トキソプラズマの細胞侵入機構の解明

研究分担者 永宗喜三郎 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

研究要旨

トキソプラズマ原虫が宿主細胞に侵入する際、宿主との接触部分において、宿主の膜貫通蛋白質の多くが排除され、GPI アンカー型蛋白質が選択的に寄生体胞膜内へ取り込まれるという現象があることが知られている。このことから、GPI アンカー又は GPI アンカー型蛋白質が、トキソプラズマ感染において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

そこで、宿主 GPI アンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響を調べるために、GPI アンカー生合成に関与する遺伝子に変異を有する 2 種類の変異 CHO 細胞における原虫に対する感受性を野生株と比較した。その結果、野生株に対して、変異細胞は約 2-3 倍感受性が上昇した。また野生株と変異株では、原虫の付着侵入過程及び感染前期の増殖においては差が認められず、感染後期の増殖のみに差が認められた。このことから、宿主の GPI アンカーあるいは GPI アンカー型蛋白質が原虫の増殖のうち、後期の増殖のみを特異的に阻害している可能性が示唆された。

一方、トキソプラズマ原虫は宿主細胞内での増殖の際、自身の周囲に宿主のミトコンドリアや ER をリクルートしてくるという現象が知られている。そこでこれらの細胞内における原虫の宿主ミトコンドリア・リクルート能を比較したところ、明らかに変異株内でのリクルートが増加していた。次にミトコンドリアや ER のリクルートメントの原因であると考えられているロプトリータンパク質に着目した。ロプトリータンパク質は原虫の細胞内への侵入に先立ち、独立した小胞 (evacuole) として原虫から宿主細胞に注入されることが知られている。原虫による evacuole の形成能を宿主の GPI の有無で比較したところ、GPI 生合成能欠失変異株では明らかに evacuole の形成が過剰になっていた。

A. 研究目的

トキソプラズマ原虫が宿主細胞に侵入する際、宿主との接触部分において、宿主の膜貫通蛋白質の多くが排除され、GPIアンカ

一型蛋白質が選択的に寄生体胞膜内へ取り込まれるという現象があることが知られている。このことから、GPIアンカー又はGPIアンカー型蛋白質が、トキソプラズマ感染

において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで本研究ではトキソプラズマ感染における宿主側GPIアンカーの役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

GPIアンカーの生合成に関与する遺伝子に変異を有する2種類の変異CHO細胞 (M2S2及びGaal(-)) に対する感染性を野生株と比較した。更に感染性の差を詳細に検討するため、野生株及びこれらの変異株における原虫の侵入能及び宿主細胞内における増殖、さらに原虫によるミトコンドリアのリクルート能を詳細に検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は全て既に確立されていたハムスター由来培養細胞を用いて行っているため倫理面での問題はない。

C. 研究結果

まず、トキソプラズマ原虫を野生株及び変異株に加え、48時間培養後の原虫の増殖を測定した。その結果、2種類の変異株は、野生株と比較して有意に原虫に対する感受性が增大していた。そこで、この感受性の上昇の原因を詳細に検討するため、野生株と2種類の変異株において、原虫の細胞侵入能を比較したところ、3種の細胞株間に有意な違いは認められなかった。続いて、原虫の宿主細胞侵入後の増殖の様子をより詳細に検討した。侵入後24時間まで、野生株および変異株内での原虫の増殖に有意な差は認められなかったが、24時間以降、トキソプラズマの増殖は変異株内において野生株に比較して優位に上昇していた。

一方、トキソプラズマは宿主細胞内での増殖の際、自身の周囲に宿主のミトコンドリアやERをリクルートしてくるという現象が知られている。そこで次にこれらの細胞内における原虫の宿主ミトコンドリア・リクルート能を比較したところ、野生株に比べて、変異株内でのリクルートが明らかに増加していた。次にミトコンドリアやERのリクルートメントの原因であると考えられているロプトリータンパク質に着目した。ロプトリータンパク質は原虫の細胞内への侵入に先立ち、独立した小胞 (evacuole) として原虫から宿主細胞に注入されることが知られている。原虫によるevacuoleの形成能を宿主のGPIの有無で比較したところ、GPI生合成能欠失変異株では明らかにevacuoleの形成が過剰になっていた。

D. 考察

以上の結果から、宿主側GPIはトキソプラズマ感染において阻害的に機能していることが示唆された。この原因の一つの可能性

として、私はトキソプラズマのミトコンドリア・リクルート能に着目して解析した。その結果、明らかに変異株内でのリクルートが増加していた。また、ミトコンドリアのリクルートメントの原因としての可能性が現在考えられているロプトリータンパク質の宿主細胞への注入はGPI生合成能欠失変異株においては明らかに過剰になっていた。これらの事実から現在、宿主GPIの欠失はevacuoleの過剰形成を伴うロプトリータンパク質群の異常分泌を起し、それが原虫侵入後にミトコンドリアのリクルートの亢進につながり、最終的に原虫の細胞内増殖の上昇につながっているのではないかと考え、現在この仮説の検証およびより詳細なメカニズムの解析を行っている。

E. 結論

宿主側GPIの欠失は、トキソプラズマ感染においてevacuoleの過形成を起し、また、ミトコンドリアのリクルート能を亢進し、原虫の増殖が上昇した。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Hirakawa, Y., Nagamune, K., and Ishida, K. "Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes." PNAS 2009, 106, 12820-5

(2) 永宗喜三郎 "植物としてのトキソプラズマ原虫：植物ホルモンとカルシウムシグナリング." 蛋白質 核酸 酵素 2009, 54: 1047-1052

(3) 青沼宏佳、田原美智留、永宗喜三郎 "トキソプラズマ、増殖の仕組み." 医事新報 *in press*

2. 学会発表

(1) 招待講演

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

(2) ワークショップ

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

(3) Tahara, M., Andrabi, S. B., Kinoshita, T., and Nagamune, K. "GPI-deficient mammalian mutant cell is hyper-sensitive to the *Toxoplasma gondii* infection." 10th International Congress on Toxoplasmosis, Karkrude, the Netherlands, June 2009

(4) 招待講演

永宗喜三郎 "The effect of GPI-deficient mutation to the *Toxoplasma gondii* infection." 筑波大学「次代を担う若手大学人育成イニシアティブ」若手フェスティバル 2009年7月、下田

(5) 田原美智留、Andrabi Syed Bilal Ahmad、木下タロウ、永宗喜三郎 "トキソプラズマ感染に宿主細胞側 GPI アンカーが与える影響" 第17回分子寄生虫学ワークショップ 2009年8月、群馬

(6) Tahara, M., Andrabi, S. B., Kinoshita, T., and Nagamune, K. "The effect of GPI-deficient mutation of the host cell to the *Toxoplasma gondii* infection." The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan, September 2009

(7) 田原美智留、Andrabi Syed Bilal Ahmad、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 アンカーの影響" 第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2009年10月、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

蠕虫遺伝子発現制御機構の解明および 寄生虫症診断法の開発

研究分担者 丸山治彦 宮崎大学医学部教授

研究要旨 寄生蠕虫の病態解明のためには寄生虫側の因子としての発現遺伝子分析が必須であり、そのためには蠕虫ゲノム情報の取得が不可欠である。われわれは、モデル寄生虫のひとつであるベネズエラ糞線虫のゲノムを新型シーケンサで解析し、総解読塩基数 1241 Mb から計 18,716 本のコンティグを得た。解読の redundancy は約 22 で、ベネズエラ糞線虫の推定ゲノムサイズは 55.4 Mb、GC 含量は 25.6%であることが明らかになった。また EST 配列との比較で、コンティグの塩基配列は真の塩基配列に十分に近いと考えられた。さらに、*C. elegans* ないしネズミ糞線虫の遺伝子情報を基に、約 7,000 のベネズエラ糞線虫遺伝子候補が同定できた。ゲノム解析と同時に幼虫移行症の血清診断法のため組換え抗原を作製し、診断抗原としての有用性を確認した。

A. 研究目的

われわれは、multiple-dot ELISA 法による迅速検査と 96-well microtiterplate ELISA 法による半定量的な精査を基本とした寄生虫症診断システムにより多くの寄生虫病の診断に関わっている。近年の寄生虫疾患の特徴として、いわゆる幼虫移行症が多いことがあげられる（表 1）。

幼虫移行症とは、ヒト体内で成虫になれない寄生虫の幼虫が人体各所をさまよひ、年余にわ

たって種々の症状を引き起こす一群の疾患のことである。その性質上すべて人獣共通感染症で、生肉などの食品によって感染することが多い。

幼虫移行症の原因寄生虫の多くは本来の宿主では腸管内に寄生し、病原性は低い。一方ヒト体内では、これらの線虫は腸管外のさまざまな臓器へ迷入して肺炎やぶどう膜炎、あるいは脊髄炎などを引き起こす。その原因は不明だが、ひとつの理由として、ヒト体内では正常な発育過程をとらないということが考えられる。

本研究では、腸管寄生虫の各発育段階における発現遺伝子発現を詳細に解析し、腸管寄生虫が宿主内でどのように発育し、それには宿主からどのようなシグナルを受け取る必要があるのかを分子レベルで明らかにしたい。

発現遺伝子解析については初年度に一定の成果を得たが、研究対象のブタ回虫もベネズエラ糞線虫もゲノムが明らかになっていないことから、徹底的かつ確実な解析をおこなうには限界がある。そこで本年度は、将来の研究に資するという意味からも、モデル寄生虫であるベネズエラ糞線虫のゲノムの概要配列を明らかにすることとした。

また同時に、将来にわたって精度の高い血清診断を続けるため、組換え抗原だけからなる幼虫移行症の検査システムを確立し、診断の標準

原因寄生虫	2004	2005	2006	2007	2008	2009
イヌ回虫						
ブタ回虫	100	103	82	101	77	47
アニサキス	0	4	4	6	3	3
イヌ糸状虫	7	1	5	1	1	0
顎口虫	11	0	0	6	7	7
鉤虫	0	1	0	1	0	0
マンソン孤虫	5	4	3	6	4	4
囊虫	4	0	0	0	0	1
肺吸虫	45	30	37	46	38	38
肝蛭	5	6	2	3	0	1
住血吸虫	5	5	6	6	4	3
肝吸虫	1	0	0	0	0	0
糞線虫	11	2	1	1	1	0
回虫	0	1	1	1	2	0
広節裂頭条虫	1	0	2	0	1	0
その他	12	9	7	3	3	3
計	207	166	150	181	141	107

表 1 過去 6 年間の宮崎大学医学部寄生虫学における寄生虫疾患診断結果

化を図る。これは、現在の血清診断システムは抗原に虫体粗抗原を用いているため、交差反応が無視できず、抗原の供給が不安定で品質にばらつきがあるからである。

B. 研究方法

1. 倫理的事項

以下に述べる研究計画は、宮崎大学動物実験委員会、宮崎大学遺伝子組換え実験安全委員会、宮崎大学病原体等安全管理委員会の審査を受け、機関承認を得ている。また、臨床材料を用いる研究は、宮崎大学医学部医の倫理委員会による審査を受け、宮崎大学医学部の承認を受けている。患者血清の使用に際しては、連結不可能匿名化処理をおこない、ヘルシンキ宣言の趣旨に則って、臨床研究に関する倫理指針等を遵守した。

2. 次世代型シーケンサによるベネズエラ糞線虫ゲノムの塩基配列解読

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫 2.8×10^6 隻からゲノム DNA を抽出し、次世代型シーケンサのひとつである 454 GS FLX を用いて塩基配列を解読した。このシーケンサを採用した理由は、ベネズエラ糞線虫の近縁種のゲノム情報が皆無であるため、ベネズエラ糞線虫のゲノムはいわゆる *de novo* 配列であり、リード長が長くないと解析不能であるためである。解読によって得られた塩基配列断片を Newbler アセンブラによってアセンブルし、連続配列（コンティグ）を得た。

次に、コンティグの塩基配列がベネズエラ糞線虫ゲノム上に実際に存在するかどうかを、初年度に作製したベネズエラ糞線虫感染幼虫の EST と比較すること、および基本的な代謝系の酵素など、存在が確実な遺伝子の塩基配列が存在するかどうかにより検討した。さらに、すでに公開されている *Caenorhabditis elegans* ゲノムやネズミ糞線虫のさまざまな発育段階の EST と今回得られたベネズエラ糞線虫のゲノムコンティグを比較し、ベネズエラ糞線虫の遺伝子候補を明らかにした。

3. 幼虫移行症診断のための組換え抗原の作製と有用性の検討

沖縄県および宮崎県内で採取されたブタ回虫から虫卵を分離して幼虫包蔵卵を形成させてウ

サギに投与し、感染 5-6 日後にウサギ肺から幼虫を回収した。次いで幼虫から polyA+ RNA を抽出・精製して逆転写反応をおこない、クロンテック社の Creator SMART システムにより cDNA ライブラリを作製した。

得られた cDNA クローンの塩基配列を決定し、公開されているブタ回虫データベースと比較した。成虫や虫卵で発現の報告がないものは体内移行期幼虫に特異的に発現している可能性が高く、診断用抗原の候補として組換えタンパク質を作製した。

以上により作製した組換え抗原の診断抗原としての適否を、宮崎大学医学部寄生虫学分野において 2005 年以前に動物由来の回虫類による幼虫移行症と診断され保管されていた患者血清を用いて検討した。本研究では病歴や生活歴、臨床所見などから真の感染と思われる症例を絞り込み、その上でイヌ回虫幼虫の ES 抗原とブタ回虫幼虫の ES 抗原を準備し、両者への反応性から、当該血清がどちらに感染した患者由来なのか推定し、ブタ回虫感染推定血清、イヌ回虫感染推定血清として用いた。

C. 研究結果

1. ベネズエラ糞線虫のゲノム解読

1) ゲノムコンティグの取得

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫 2.8×10^6 隻から計 42.3 μ g のゲノム DNA が得られた。そのうち 5 μ g を次世代型シーケンサ 454 GS FLX の 1 ランに用い、計 3 ランをおこなった。

3 回のランによる総リード数は 3,328,633、平均リード長は 373 塩基であった。これらの配列をアセンブルして計 18,716 本のコンティグが得られた。平均コンティグ長は 2,958 塩基、N50 コンティグ長（これより長いコンティグに総塩基数の 50%が含まれる）は 11,789 塩基、最長コンティグ長は 200,865 塩基であった。

以上のコンティグに含まれる塩基配列の総計は 55,376,589 塩基（55.4 Mb）であり、これがベネズエラ糞線虫のゲノムサイズであると推定された。解読塩基総数が 1,240,745,568 塩基（1241 Mb）であったので、解読の *redundancy* は約 22 であると計算され、現段階で取得している配列データは、ベネズエラ糞線虫の全ゲノムを十分にカバーしているであろうと考えられた。

また、ベネズエラ糞線虫ゲノムの特徴として、

GC 含量が 25.6%であるということが新たにわかった。

2) ゲノムコンティグと EST 配列との比較

初年度において取得したベネズエラ糞線虫の感染幼虫の EST データと、今回得られたゲノムコンティグを比較することで、ゲノムコンティグの品質検定をおこなった。

ベネズエラ糞線虫の感染幼虫 EST から得られた 194 個のコンセンサス配列のうち 500bp 以上の長さを持つものを問い合わせ配列とし、カットオフ値を $1e-30$ に設定してゲノムコンティグデータを Blastn 検索した。その結果、85 配列のうち 84 配列 (99%) がヒットした。以上より現段階で得られているゲノムコンティグの塩基配列は、ベネズエラ糞線虫のゲノム上に実在すると考えてよいことがわかった。

またこの解析の過程で、ベネズエラ糞線虫のタンパク質コード領域ではイントロンが短いことがわかり、ベネズエラ糞線虫の遺伝子は比較的コンパクトにまとまっていることが示唆された。

3) ゲノムコンティグと他種生物遺伝子との比較

ベネズエラ糞線虫のゲノムコンティグの配列情報を基に、Eukaryotic GeneMark アルゴリズムを用いて、約 20,000 の遺伝子モデルを作成した。カットオフ値を $1e-30$ に設定して blastP を用いた相同性検索で、遺伝子モデルのうち 5,560 モデルについては、他の生物種において類似の遺伝子を見出すことが可能であった。

逆に *C. elegans* に存在する 24 種類の解糖系/糖新生系酵素のアミノ酸配列のうち、aldose 1-epimerase と alcohol dehydrogenase 以外の酵素はベネズエラ糞線虫のゲノムコンティグ中に全てみつかった。すなわち、現ゲノムコンティグは、存在するはずの遺伝子のほとんどを含んでいると考えられた。

また、ゲノムコンティグ中に含まれる遺伝子を同定する目的で、すでに公開されている *C. elegans* ゲノムやネズミ糞線虫のさまざまな発育段階の EST と、今回得られたベネズエラ糞線虫のゲノムコンティグを比較した。その結果、ネズミ糞線虫 EST 配列 27,366 本 (平均 521bp) のうち 23,919 個を約 5,000 の loci にマップすることができた (カバー率 80%以上の top hit を採

用)。 *C. elegans* のタンパク質コード遺伝子については、20,236 遺伝子のうち 12,122 本をベネズエラ糞線虫ゲノムコンティグ中 4,995 箇所マップすることができた (カバー率 50%以上の top hit を採用)。両者の約 6 割に当たる 3,000 loci ほどが重なっており、冗長性を除去すると、約 7,000 loci のベネズエラ糞線虫の遺伝子候補を同定することができた。

2. 幼虫移行症診断のための組換え抗原の作製と有用性の検討

1) ブタ回虫組換え抗原の作製

ブタ回虫の体内移行期幼虫の cDNA ライブラリを作製し、ランダムに 1722 クローンの塩基配列を決定し、175 種類のユニークな配列を得た。これらの配列データを、ブタ回虫の幼虫包蔵卵や成虫および他種線虫の EST データベースと比較したところ、ブタ回虫以外の線虫類と相同性を有するものや、これまで公開されているどの配列とも有意の相同性がないものが得られた (表 2、表 3)。

公開データベースにブタ回虫体内移行期幼虫の EST はないことから、これらはブタ回虫の肺移行期幼虫に特異的な配列と考えられた。この中からわれわれは、イヌ回虫の C-タイプレクチンのブタ回虫ホモログと考えられるタンパク質 As-CTL-1 と、ブタ回虫感染に対するワクチン候補 As16 を診断抗原候補として作製した。

このふたつのタンパク質を選んだ理由は、両者とも肺から回収した幼虫の cDNA ライブラリ中のクローンの出現頻度が高く、患者の免疫系が強く感作されている可能性が高いと考えたこと、ならびにイヌ回虫 C-タイプレクチンの全長がすでにクローニングされ診断用抗原としてある程度検討されているので、イヌ回虫とブタ回虫の相同タンパク質を同時に幼虫移行症の患者血清と反応させることで、両者を鑑別できる系が確立できる可能性があると考えたからである。

Classification	No. of contigs
<i>A. suum</i>	123
Other nematodes	17
Non-nematodes	4
No significant similarity	31
Total	175

表 2 ブタ回虫体内移行期幼虫の EST 解析

Identification	Closest species	E value
Ribosomal protein L35a	<i>M. yessoensis</i>	3.0E-69
Excretory/secretory mucin MUC-5	<i>T. canis</i>	5.0E-19
Aspartyl protease protein 6	<i>C. elegans</i>	2.0E-31
Novel transcript	-	-
Novel transcript	<i>T. stromaticum</i>	3.0E-08
C-type lectin Tc-ctl-4	<i>T. canis</i>	2.0E-20
Novel transcript	-	-
Novel transcript	-	-
Novel transcript	-	-
Hypothetical protein Bm1_33605	<i>B. malayi</i>	2.0E-11
Novel transcript	-	-
Novel transcript	-	-
Serum- and Glucocorticoid- inducible kinase homolog	<i>C. elegans</i>	4.0E-25
Protein unc-22	<i>B. malayi</i>	1.0E-62
CBR-MEC-2 protein	<i>C. briggsae</i>	3.0E-28
Novel transcript	<i>T. canis</i>	2.00E-14
Novel transcript	<i>T. canis</i>	0.0
Novel transcript	<i>P. suffruticosa</i>	1.0E-52
Aspartyl protease protein 6	<i>C. elegans</i>	2.0E-11
Keratin associated protein 16-1	<i>M. musculus</i>	4.0E-06
Putative glycoprotein hormone-beta5	<i>B. malayi</i>	9.0E-37
Hypothetical protein CBG18583	<i>C. briggsae</i>	9.0E-14
Novel transcript (single clone)	-	-

表3 既存データベースのブタ回虫遺伝子と相同性のない新規EST

2) 患者血清を用いた組換え抗原の検討

組換えブタ回虫抗原の幼虫移行症患者血清との反応を酵素抗体法で検討した。患者血清は、宮崎大学医学部寄生虫学分野において2005年以前に診断目的で送付され-80℃に保管されていた残余検体で、この中から抗体検査の結果に加えて、病歴、各種画像、生食歴等から、確実に動物由来の回虫類による幼虫移行症であろうと診断された48検体を選んだ。選択後は対応表を破

棄し、連結不可能匿名化して使用した。

これら患者血清の、イヌ回虫第3期幼虫のES抗原(TcES)ならびにブタ回虫体内移行期幼虫のES抗原(AsES)に対する結合を図1に示した。吸光度で比較すると、AsESよりもTcESに強く反応したものが33サンプル、AsESとTcESに同程度に反応したものが11サンプル、AsESの方に強く結合したものが4サンプルあった(図1A)。一方、これを吸光度そのままではなく、ブタ回虫抗原AsESに対する吸光度とイヌ回虫抗原TcESに対する吸光度の比をとったものが図1Bである。

幼虫ES抗原は診断的価値がきわめて高く、原因虫種の推定に役立つとされる。図1から、AsESとTcESの比が5.0を超える3サンプル(AT、AU、AV)はブタ回虫感染患者の血清であり、残りのサンプルはイヌ回虫(もしくはトキソカラ)感染患者の血清であることが強く示唆された。つまり、内臓幼虫移行症患者のうち、約6%がブタ回虫症であると推定された。

次にこれらの血清サンプルの、組換えブタ回虫抗原As-CTL-1とAs16への結合を示したのが図2である。単純な吸光度の比較では、トキソカラ感染推定血清とブタ回虫感染推定血清との結合に有意な差はみとめられなかった(図2A)。しかしながら、図1と同様にイヌ回虫幼虫のES抗原との比をとると、ブタ回虫感染血清と推定された3サンプルでは高い値をとることが示された(図2B)。このことは、両組換え抗原ともに、トキソカラES抗原と組み合わせることで、ブタ回虫感染の鑑別診断用抗原として使用可能であることを示す。As-CTL-1とAs16の比較ではAs16の方が高い値を示しており、診断用抗原としてより優れていると考えられた。

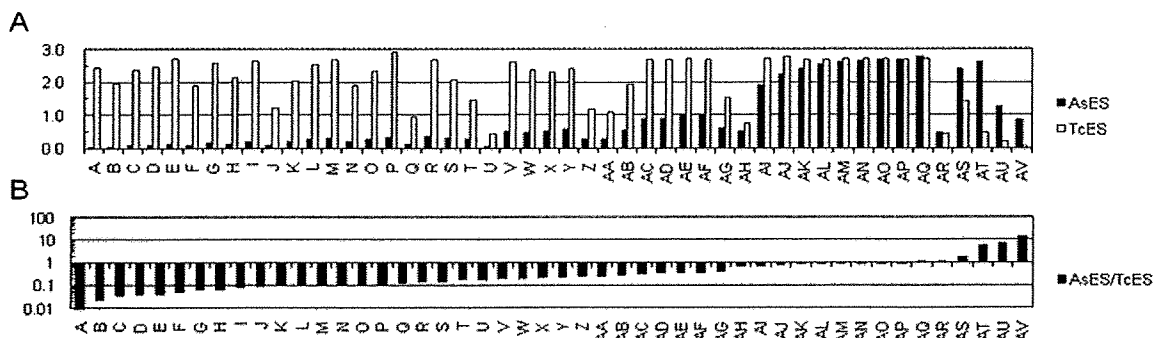


図1 内臓幼虫移行症患者血清とイヌ回虫/ブタ回虫幼虫ES抗原との反応
A: ブタ回虫ES抗原とイヌ回虫ES抗原に対する結合(単位は吸光度)
B: ブタ回虫ES抗原とイヌ回虫ES抗原に対する結合の吸光度の比

D. 考察

1. ベネズエラ糞線虫ゲノムの特徴

本年度の研究において、これまでまったく情報のなかったベネズエラ糞線虫のゲノムについて一端を知ることができた。

従来、未知の真核生物ゲノムの解析は、きわめて膨大なコストと時間を必要とすることから、単一研究室レベルではおよそ実行不可能であった。これが、次世代型新型シーケンサの登場によって *de novo* ゲノム解析が一気に加速するとの見方があったが、われわれの研究はこれを裏付ける形となった。今回のベネズエラ糞線虫ゲノムの解読は、近縁種ゲノムも明らかでなく、遺伝地図や物理地図などの情報が皆無なまま実行された。本研究の成果は他の寄生虫ゲノムの解読に弾みを付けるものと考えられる。

今回の解析において、ベネズエラ糞線虫ゲノムの重要な特徴がいくつか明らかになった。まず第一に、ゲノムサイズが 55.4 Mb 前後と推定されたことである。これは自由生活線虫の *C. elegans* や *C. brigssae* のおよそ半分であり、植物寄生線虫の *Meloidogyne hapla* と同程度である。

生物一般の特徴として、寄生種は自由生活種に比べてゲノムサイズが小さい傾向にある。糞線虫類は寄生世代と自由生活世代を持つので、そのゲノムは非常に興味を持たれるところである。今回の結果は、自由生活世代があっても比較的小さなゲノムで対応できていることを示唆している。

研究の実際的な面からは、ゲノムサイズが 200-300 Mb あるいはそれ以上であると、全ゲノム解析には膨大な数のリード数が必要になり、新型シーケンサといえども十分な *redundancy* を得るためのラン数は大幅に増えることになる。

その点、ベネズエラ糞線虫のゲノム解読では 3 回のランでほぼ飽和状態のデータが得られた。完全に未知のゲノムであった割には幸運に恵まれたと言えるかも知れない。

一方、ベネズエラ糞線虫ゲノムの他の特徴として、GC 含量が 25.6%ときわめて低いことがあげられる。これはマラリア原虫に匹敵する値であり、今後ゲノムの構造を詳細に決定するときの障害になることが予想される。例えば、今回の解析では、*redundancy* は約 22 と計算されるにもかかわらずコンティグは 18,716 本もある。これは AT に富む繰り返し配列部分でコンティグが分断されているのが、少なくとも原因の一部と考えられる。454 GS FLX が採用しているパイロシーケンシングはホモポリマー部分の解読を苦手とするので、AT に富む配列が解析を阻害する可能性は高い。

しかしながら、以上のような困難があっても、ゲノムコンティグと EST や他種生物遺伝子との比較から、現段階でベネズエラ糞線虫遺伝子のほとんどの配列がすでに得られていると考えられる。今後は cDNA の配列データを加えてスキヤップオールディングをおこない、ベネズエラ糞線虫ゲノムの概要配列を決定する予定である。

2. 血清診断用組換え抗原

幼虫移行症、とくにイヌ回虫やブタ回虫感染では、虫体自体を検出することは不可能に近い。したがって血清診断の重要性がきわめて高いが、現行の診断システムでは、感染によって産生されている「真の抗体」と他の原因によって産生されながら交差反応をしめす「偽の抗体」の区別は難しく、さらに原因寄生虫がイヌ回虫なのかブタ回虫なのかも区別できない。

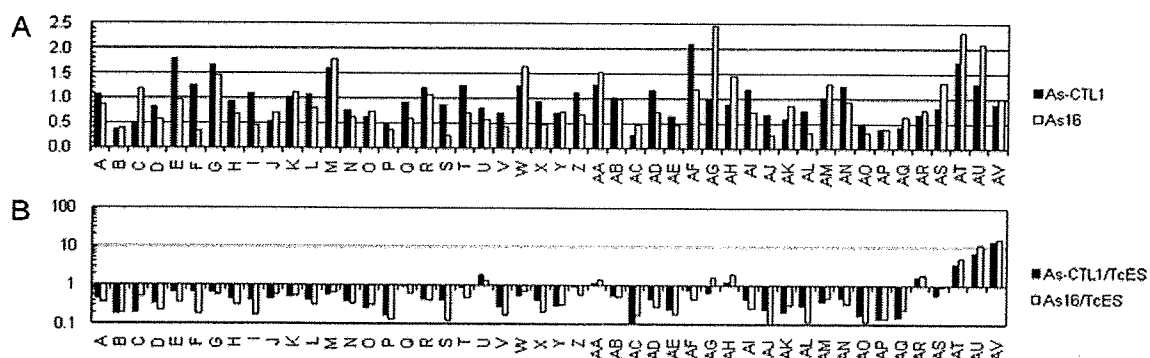


図2 内臓幼虫移行症患者血清と組換えブタ回虫ES抗原との反応

A: As-CTL1とAs16に対する結合(単位は吸光度)

B: As-CTL1とAs16のTcESに対する吸光度の比

この問題点を解決するひとつの方法として、組換え抗原による系を確立することがあげられる。用いるタンパク質を注意深く選ぶことで、真の感染のみを検出し、イヌ回虫とブタ回虫を峻別できる系を確立することも可能であると考えられるからである。

われわれは、ブタ回虫の体内移行幼虫の cDNA ライブラリを作製してクローンの塩基配列を網羅的に決定し、ブタ回虫 C タイプレクチン As-CTL-1 と、ワクチン候補分子である As16 を選定して組換えタンパク質を作製し、これらのタンパク質と、臨床症状などから幼虫移行症患者であることが確実な患者血清との結合を精査した。

結合試験の結果からは、As-CTL-1 と As16 は両者とも単純な結合アッセイではトキソカラ感染とブタ回虫感染を区別できなかったが、同一血清のトキソカラ ES 抗原への結合との比をとると、ブタ回虫感染血清と考えられるサンプルを特定することができた (図 2)。

信頼性が高い幼虫 ES 抗原の結果と一致するということは、As-CTL-1 と As16 はブタ回虫感染症診断のための抗原として、きわめて有望であるということを示す。今後はトキソカラの組換え抗原 (Tc-CTL-1 等) を組み合わせたアッセイ系を組み立て、組換え抗原のみを用いた幼虫移行症診断システムを完成させることを目標とする。

E. 結論

モデル腸管寄生線虫であるベネズエラ糞線虫のゲノムの配列情報を 18,716 本のコンティグとして取得し、ゲノムサイズ 55.4Mb、GC 含量 25.6%と推定することができた。また、約 7000 個のベネズエラ糞線虫遺伝子の同定をおこなうことができた。

ブタ回虫の体内移行期に発現している ES 抗原の組換えタンパク質 As-CTL-1 と As16 を調製し、幼虫移行症の診断用抗原としての有用性を患者を用いた検討により確認した。

F. 研究発表

著書

1. 丸山治彦 (2009) 胆道寄生虫症 (内科学書 改訂第 7 版 vol.4 消化管・腹膜疾患・肝・胆道

・瘵疾患. p.334-335.) 中山書店 (東京)

2. 丸山治彦 (2010) 鉤虫症 (十二指腸虫症) (今日の治療指針 2010、山口徹、北原光夫、福井次矢編)、pp.214-215、医学書院 (東京)

症例報告

1. Senba Y, Tsuda K, Maruyama H, Kurokawa I, Mizutani H, Taniguchi Y. (2009) Case of creeping disease treated with ivermectin. J Dermatol. 36: 86-89.
2. Enko K, Tada T, Ohgo KO, Nagase S, Nakamura K, Ohta K, Ichiba S, Ujike Y, Nawa Y, Maruyama H, Ohe T, Kusano KF. Fulminant eosinophilic myocarditis associated with visceral larva migrans caused by *Toxocara canis* infection. Circ J. 73: 1344-1348.

学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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

7. 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）
8. 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）
9. 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）
10. 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）
11. 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）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

エキノкокスの嫌氣的呼吸鎖の生理機能の解明

研究分担者 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な阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる。本研究はエキノкокスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。本年度の研究の結果、蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系がエキノкокスにおいてもその生存に必須である事を見出し、特異的な阻害効果を示すリード化合物を見出す可能性は高い。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必要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。この成果をふまえ蠕虫のモデル系としての回虫、また寄生原虫として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、最終的に化学療法法の標的として捉えたいと考えている。

エキノкокス症はわが国でも患者数が減少せず、一方北海道におけるキタキツネの感染率は50%を超えている。この条虫感染症の最大の問題点は効果的な治療薬がない事であり、病原体である多包虫を殺滅する薬剤の開発は性質の類似している単包虫も含め、国際的な視野からも意義深い研究である。本研究では、これまでに我々が得て来た寄生虫ミトコンドリアに特異的なエ

ネルギー代謝系を標的とした薬剤開発を進め、エキノкокス症に対する有効な治療薬のリード化合物を見出す事を目的としている。

B. 研究方法

条虫類に属するエキノкокスは同じく寄生蠕虫に属する線虫類の回虫と同様に腸管寄生虫であり、その生活環から考えて、低酸素の環境下に嫌氣的呼吸鎖を利用している可能性があると予想された。そこでミトコンドリアにおけるエネルギー代謝、特に回虫などで見られる嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元酵素系を中心とする呼吸系の解析を進めるため、活性を保持したミトコンドリアの単離法を確立し、研究の進んでいる回虫成虫ミトコンドリアとその性質を比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は大部分が in vitro の実験系であり、倫理面の問題はない。また、コットンラットを用いた感染実験は北海道大学、北海道

立衛生研究所の動物実験倫理規定に基づいて行った。

C. 研究結果

1. エキノコックス原頭節ミトコンドリアの呼吸鎖

前年度までの研究においてエキノコックスを感染させたコットンラットの肝臓より原頭節を分離し、その組織・細胞を破碎して遠心分離を繰り返す事によって微量ではあるが、生化学的解析に充分耐え得るミトコンドリア画分の調製法を確立した。その結果、嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系の活性 (45 nmol/min/mg) に対して好氣的呼吸鎖である NADH オキシダーゼ活性 (9.1 nmol/min/mg) は低く、エキノコックス原頭節ミトコンドリアでは嫌氣的呼吸鎖を主要成分となっていた。

さらに、原頭節ミトコンドリア呼吸鎖の性質を調べた所、好氣的呼吸鎖の末端酸化酵素であるシトクロム c 酸化酵素の阻害剤 KCN の存在下でも NADH 酸化の残存活性が観察された。このシアン耐性の NADH 酸化活性は複合体 II の阻害剤であるマロン酸の添加により大部分が阻害された事から、複合体 II が酸素と反応すると考えられた。

2. 複合体 II と酸素の反応

複合体 II は哺乳類など好気性生物では TCA 回路におけるコハク酸酸化系として機能しているが、低酸素環境下の NADH-キノン還元系では逆反応であるキノール-フマル酸還元酵素 (QFR) として機能している。この複合体 II と酸素との反応を検討した結果、ブタ回虫ではフマル酸還元に対して 85% と高い効率で酸素と反応したのに対し、エキノコックスではフマル酸還元反応の 16% しか酸素と反応しなかった。

最近、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体 II と酸素の反応はがんや寿命などの関連から哺乳類や線虫などでも注目されており、特に酸素との反応において発生する活性酸素は直接タンパク質や DNA 等への障害のみならず、酸化ストレスや低酸素適応の関するシグナル分子としても機能している事が判って来ている。しかし、哺乳類も含め複合体 II からの活性酸素発生のメカニズムに関する研究はほとんど行なわれていなかった。そこで、酸素との反応性の高い回虫成虫複合体 II を用い、活性酸素発生部位を明らかにする目的で研究を進めた。

3. 回虫複合体 II の活性酸素発生部位

この実験では、水溶性の電子供与体である還元型メチルピオロゲンを用いて測定する複合体 II のフマル酸還元酵素活性 (FRD) が成虫より低い第 3 期ステージの幼虫 (L3) を対照として用いた。それぞれのサンプルの筋肉から、抗酸化物質や抗酸化酵素を除去するために超音波処理を行なって調製した垂ミトコンドリア粒子を用いて複合体 II から発生する ROS を解析したところ、L3 ステージの幼虫に比べて成虫で非常に多量の活性酸素の発生が観察された。その活性酸素種は主にスーパーオキシドであり、過酸化水素はわずかであった。さらに複合体 I (NADH-キノン還元酵素) の阻害剤であるキナゾリンやロテノン、また複合体 II の阻害剤の効果から、回虫成虫ミトコンドリアからの活性酸素発生はそのほとんどが複合体 I ではなく、複合体 II からである事が判った。

次に複合体 II の活性酸素の発生部位を明らかにするため、まずコハク酸依存の活性酸素発生に対するコハク酸の濃度の影響を調べたところ、1 mM が最高のスーパーオ

キシド発生の活性(約 400 nmol/ min/ mg)を与え、10 mM では半分以下、100 mM では 50 nmol/ min/ mg 以下に低下した。これは大腸菌の酵素で報告されている様に、基質であるコハク酸が活性酸素発生部位の候補の一つである Fp サブユニットに結合している補欠分子族である FAD への酸素の接近を妨げているからと考えられる。さらに特異的阻害剤の影響を調べた結果、基質であるコハク酸の競合阻害剤であるマロン酸は完全に活性酸素発生を抑制したのに対して、キノン結合部位の阻害剤であるアトペニンは 38% の阻害を示した。この事は回虫成虫複合体 II からの活性酸素発生の 60% 近くは FAD の部位からであり、残りがキノン結合部位からである事を示している。

さらに、ヒト細胞について複合体 II の FRD 活性が正常細胞よりも高いことが知られている大腸がん由来の細胞を用いてミトコンドリア、及び生細胞から ROS の発生を解析した。この実験ではヒト皮膚線維芽細胞を正常細胞対照として用いた。その結果、がん細胞から活性酸素の発生が観察されたが、一方、ヒト正常細胞からはその発生は見られなかった。以上の結果から、FRD 活性を持つ複合体 II からは活性酸素がより多量に発生する事が明らかになった。

D. 考察

エキノコックス症はその治療にアルベンダゾールなどが一部用いられているが、特効薬と呼ぶにはほど遠い。途上国に限らず、先進国にもその感染は多く見られ、わが国でも北海道の多包条虫症はキタキツネの高い感染率と相まって、大きな問題となっている。このエキノコックスの特異的な代謝系を標的として新規の薬剤開発をめざすのが本研究の最終的目的である。

この目的のためにエキノコックスの生活環を考えると、ほとんど酸素を利用していないと考えられる。すなわち成虫は酸素分圧の低い腸管に寄生し、また唯一外界に接する虫卵のステージはエネルギーを必要とする発生は終わっているため酸素は必要としない。また幼虫の生息する肝臓などの環境も包虫の状態では酸素の供給は低い。そこで低酸素環境下で機能する NADH-フマル酸還元系が生活環を通してエキノコックスの生存に必須であり、化学療法的好適な標的と考えられる。

最近、がん、老化や寿命等に関してミトコンドリアの複合体 II からの活性酸素が重要な役割を果たしている事が明らかになって来たが、その発生機構についてはほとんど報告がなかった。今回、回虫成虫複合体 II の生化学的解析から複合体 II と酸素の反応に関する興味深い知見が得られた。NADH-フマル酸還元系では複合体 II は QFR として機能する。すなわちフマル酸を還元する酵素であり、フマル酸の反応部位である FAD に電子が蓄積しているとフマル酸との反応に有利である。この事はヒトのがん細胞も含め、「フマル酸還元活性の高い複合体 II は活性酸素生成能が高い」と一般化できる可能性を示している。

しかし、エキノコックスの酵素ではフマル酸還元反応と酸素との反応は必ずしも相関するわけではない。すなわち、エキノコックスの複合体 II は高いフマル酸還元活性を持つにもかかわらず、酸素との反応性は回虫成虫の酵素より低い。つまりエキノコックスの酵素の方が酸素共存下での電子放出の低い、寄生虫にとって安全性の高い酵素であると考えられる。

エキノコックス酵素の更なる解析により、酸素との反応性を抑えつつ、フマル酸還元

反応を維持する機構を明らかにする事ができると考えられる。そこで現在、エキノコックス複合体 II の全サブユニットのアミノ酸配列を決定する目的で cDNA クローニングを行なっている。

コットンラットに感染させて得た宿主組織を含むエキノコックス幼虫から cDNA を調製し、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 II を構成する Fp, Ip, CybL, CybS の 4 つのサブユニットおよび 2 つのアッセンブリーファクター SDHAF1, SDHAF2 についてサンガー研究所の EST データおよびゲノムデータをもとに ORF の特異的プライマーにより増幅し、配列を決定した。この配列をもとに、それぞれの遺伝子から 5'-RACE、3'-RACE にて特異的 DNA 断片が増幅できた。それぞれについてクローニング、配列決定を進行中であり、現在までに Fp, Ip, CybS について配列決定が完了している。回虫成虫の酵素に関しては、京都工芸繊維大学の原田繁春教授のグループとの共同研究によって最近結晶解析が進んでおり、エキノコックスの酵素のアミノ酸配列が決定できれば、活性酸素発生の少ないフマル酸還元酵素の実態をアミノ酸レベルで明らかにできると考えられる。

E. 結論

本研究はエキノコックスに特異的な代謝系を標的とする治療薬の開発を目的としている。本研究の結果、蠕虫類に共通な嫌氣的呼吸鎖である NADH-フマル酸還元系がエキノコックスにおいてもその生存に必須である事を見出した。しかもエキノコックスの複合体 II は宿主哺乳類や回虫とは異なった性質を持ち、これを標的とした新規薬剤開発の可能性は高い。また、今回の研究

は呼吸鎖複合体 II からの活性酸素発生機構の理解に大きく貢献するものであり、臨床的にも複合体 II から発生する活性酸素と低酸素適応やがんに関する研究の進展に極めて重要な発見であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) FEMS Microbiol. Lett. 291, 157-161
- 2) 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. (2009) J. Biochem. 145, 229-237
- 3) 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. (2009) Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics) 1787, 129-133
- 4) 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 (2009) *Cell Metabolism*, 9, 191-202
- 5) 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. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 7255-7263
- 6) Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with specific inhibitor, flutolanil. Osanai, A., Harada, S., Sakamoto, K., Shimizu, H., Inaoka, D. K., and Kita, K. (2009) *Acta Crystallographica*, F65, 941-944
- 7) Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits *a* and *b* in *Plasmodium* spp. Mogi, T. and Kita, K. (2009) *Mitochondrion*, 9, 443-453
- 8) Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. Matoba, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Inaoka, D.K., Kita, K. and Harada, S. (2009) *Acta Crystallographica*, F65, 933-936
- 9) Three redox states of *Trypanosoma brucei* alternative oxidase identified by infrared spectroscopy and electrochemistry. Maréchal, A., Kido, Y., Kita, K. Moore, A. and Rich, P. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 31827-31833
- 10) The *Plasmodium* HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival, Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki, S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., Kita, K., Sato, S., (2009) *FEBS Lett.* 583, 1446-1450
- 11) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. (2010) *Acta Crystallographica* F66, 275-278
- 12) Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and Kita, K. (2010) *Acta Crystallographica* F66, 304-308
- 13) Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and

Kita, K. (2010) Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics) 1797, 443-450

- 14) Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species (ROS) from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. Paranagama, M. P., Sakamoto, K., Amino, H., Awano, M., Miyoshi, H. and Kita, K. (2010) Mitochondrion, 10, 158-165

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 城戸康年、原田繁春、齋本博之、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
- 3) 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
- 4) 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 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月

- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働省科学研究費補助金
(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

蠕虫の腸管感染排除機構の解明

研究分担者 中西憲司 兵庫医科大学 教授

研究要旨

細胞内寄生原虫が感染すると、これを排除するため Th1 型の免疫応答が誘導される。一方、蠕虫が感染すると、Th2 型の免疫応答が誘導される。Th1 細胞の誘導は樹状細胞の作用によるが、Th2 細胞の誘導にどの自然免疫系細胞がどの様に関与するのか不明であった。そこで、本研究では Th2 細胞を誘導する自然免疫系細胞の同定に努めた。その結果、好塩基球が、Th2 細胞の誘導および／または増加に寄与する抗原提示細胞であることを明らかにした。

A. 研究目的

好塩基球は全顆粒白血球の 1% 弱を占める少数派細胞である。好中球あるいは好酸球と異なり、好塩基球は細菌あるいは寄生虫が感染しても末梢血中の細胞数が増加することはない。しかし、寄生虫が感染した動物の肝臓や脾臓では、好塩基球の数が著明に増加するとともに、Th2 細胞が誘導される。好塩基球は、肥満細胞とともに、IgE 媒介性のアレルギー性炎症のエフェクター細胞として重要である。しかし、両者の特筆すべき違いは、肥満細胞が組織に固着するのに対し、好塩基球は末梢血中を巡回することである。本研究で、好塩基球の Th2 細胞の誘導機能を解明することを目的に研究した。

B. 研究方法

好塩基球の濃縮：

正常マウスあるいは、*Strongyloides venezuelensis* を感染させたマウスの脾臓から、T 細胞と B 細胞を除去することで、好塩基球を濃縮する。次に、これ

らの中から $Fc\epsilon R1^+cKit^-$ 細胞を選別濃縮することで好塩基球を得る。

1) in vitro における Th2 細胞の誘導：ナイーブ $CD4^+$ T 細胞を Th2 細胞に分化させるには、抗原刺激と IL-4 刺激の両方が必要である。そこで、初めに好塩基球が MHC class II を細胞表面に発現することを FACS で、更に IL-4 を産生することを ELISA で検討する。次に、好塩基球が in vitro で Th2 細胞を誘導するか検討する。OVA 特異的ナイーブ $CD4^+$ T 細胞を、抗原提示細胞と抗原 (OVA 蛋白、OVA ペプチド、あるいは DNP-OVA/抗 DNP-IgE 複合体) で刺激する際、IL-4 非存在下 (中立培養条件) あるいは存在下 (Th2 細胞誘導条件) で培養し、Th2 細胞が誘導されるか検討する。

2) in vivo における Th2 細胞の誘導：最後に、微量の DNP-OVA/抗 DNP-IgE 複合体をナイーブなマウスに投与することで、マウスが有する内因性の好塩基球の作用で Th2 細胞が選択的に誘導されるか検討する。

(倫理面の配慮)

動物実験は、関係法令を遵守し、「兵庫医科大学動物委員会」、「兵庫医科大学遺伝子組み換え委員会」の承認・許可された実験を行なっている。

C. 研究結果

非感染マウスの脾臓から得た好塩基球は、*in vitro* で IL-4 を産生するが、*S. venezuelensis* を感染させたマウスの脾臓から得た好塩基球は、正常マウスの脾臓由来の好塩基球に比して、約 10 倍以上の IL-4 を産生する能力を有していた。次に、両好塩基球の Th2 細胞誘導能を比較検討したところ、両好塩基球とも *in vitro* では同程度の Th2 細胞誘導能を示した。そこで、これらの好塩基球がどのような機序で Th2 細胞を誘導するのか検討した。その結果、好塩基球が *in vitro* で抗原を取り込んで断片化し表面に提示するとともに、IL-4 を産生することが明らかとなった。更に、好塩基球由来の IL-4 存在下で好塩基球の表面に提示された抗原ペプチド/MHC class II 分子複合体で刺激されたナイーブ T 細胞が Th2 細胞に分化することが明らかとなった。従って、好塩基球が Th2 細胞を選択的に誘導する抗原提示細胞であることが明らかとなった。また更に、好塩基球を IL-3 存在下で DNP-OVA と培養すると OVA を取り込むこと、更に DNP-OVA /anti-DNP IgE mAb (IgE 複合体) と培養すると、OVA の取り込み効率が亢進することが明らかとなった。最後に、DNP-OVA /anti-DNP IgE mAb を正常マウスに投与すると、脾臓内で OVA 特異的 Th2 細胞が誘導されること、そして、その誘導には、まず、好塩基球が DNP-OVA /anti-DNP IgE mAb 複合体を取り込み、OVA 特異的 Th2 細胞を誘導することが必須であることが明らかとなった。

D. 考察

今回の研究で、好塩基球が Th2/IgE 応答を誘導することが明らかとなったので、実際に、好塩基球が寄生虫感染の制御に、直接関与することを明らかにしたい。

E. 結論

好塩基球が *in vitro* 並びに *in vivo* で抗原を取り込み、MHC class II に抗原ペプチドを結合すること、CD80/86 を発現すること、更に IL-4 を産生することで、Th2 細胞を *in vitro/in vivo* で選択的に誘導することが明らかとなった。また更に、抗原/IgE 複合体が生体内で形成されると、これを効率的に取り込み、Th2 応答を更に増強することも明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当せず。