

- H., Arisue, N., Palacpac, N. M. Q., Kawazu, S., Sawai, H., Horii, T., Igarashi, I. and Tanabe, K. *Mol. Biol. Evolution* (2010) 27, 1107-1116
- 3) 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. *Acta Crystallographica* (2010) F66, 304-308
- 4) 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. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* (2010) 1797, 443-450
- 5) Extensive frameshift at all AGG and CCC codons in the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene of *Perkinsus marinus* (Alveolata; Dinoflagellata). Masuda, I., Matsuzaki, M. and Kita, K. *Nucleic Acids Research*. (2010) 38, 6186-6194
- 6) Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H. and Kita, K. *Parasitol. Int.* (2010) 59, 560-564
- 7) Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N. M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K. and Tanabe, K. *Mitochondrion*, (2010) 11, 273-278
- 学会発表
- 1) 畑 昌幸、佐藤 恵春、北 潔 「熱帯熱マラリア原虫からの生化学的解析を目的としたミトコンドリア調製法の確立」第 66 回日本寄生虫学会西日本支部大会平成 22 年 11 月
- 2) 志波智生、城戸康年、稲岡ダニエル健、坂元君年、奈良 武司、青木孝、本間光貴、田仲昭子、井上将行、松岡 茂、Anthony Moore、原田繁春、北潔 「Trypanosome Alternative Oxidase (TAO)の結晶構造解析」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 平成 22 年 12 月
- 3) Balogun, Emmanue Oluwadare, Inaoka Daniel Ken, Kido, Yasutoshi, Tomoo Shiba, Harada, Shigeharu, Kita, Kiyoshi 「Structure of glycerol kinase from human African trypanosomes」第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 平成 22 年 12 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

## アジアの三日熱マラリア原虫の遺伝的集団構造の解明

研究分担者 狩野 繁之 国立国際医療研究センター研究所部長  
研究協力者 石上 盛敏 国立国際医療研究センター研究所上級研究員

**研究要旨** 本研究では、三日熱マラリア原虫(Pv)ミトコンドリア(mt)DNA塩基配列に基づく分子系統解析を行い、現生Pv集団の起源と拡散の過程を明らかにすることを目的とした。同ゲノム塩基配列に関して、すでにGenBankデータベースに世界各地の検体のデータが報告されているが、韓国やフィリピンなど、まだ報告がない国や地域が残されている。そこで本研究では、アジアの三日熱マラリア原虫のゲノムを解析し、すでに報告された検体のデータと共に分子系統解析を行うことで、これまでにないより精度の高い現生Pv集団の分子系統樹の構築を目指した。本解析の結果、同原虫集団は、地理的に非常に分化していることが明らかになった。韓国のPv集団は遺伝的に異なる2つの集団からなり、それらは遺伝的に異なる2つの中国南部のPv集団と近縁であった。フィリピンのPv集団は、インドシナ半島のPv集団と近縁であった。上記の結果より、韓国並びにフィリピンのPv集団はヒトの移動に伴って拡散したものと推定された。さらに本解析方法の応用として、国立国際医療研究センターを訪れた輸入三日熱マラリア患者検体を解析した結果、どの検体も患者の渡航先由来のPv集団を含むクラスターに含まれた。したがって本解析方法は、患者の感染地推定にも有効であると考えられた。

### A. 研究目的

近年、地球規模のマラリア対策により熱帯熱マラリア患者数は減少傾向にあり、特にアジア、中南米諸国では、三日熱マラリアの重要性が増している。しかし、三日熱マラリア原虫(Pv)に関する研究は非常に遅れている。本研究では、現生Pv集団の起源と拡散の過程を明らかにすることを目的として、Pvの分子系統解析を行った。特にGenBankにまだDNA情報が報告されていない韓国、フィリピンといったアジア地域との国際医学協力を行いながら、それぞれの地域の検体を解析し、Pv集団の進化遺伝学的な位置の推定を試みた。次に同解析によって得られた成果を応用して、三日熱マラリア患者検体がどの地域由来の株であるかを推定し、治療ならびに治療後のフォローアップを行う医師に、その患者が感染したと推定される地域の三日熱マラリアの疫学情報を提供し、臨床管理に役立てることを試みた。

### B. 研究方法

1) 材料は分担研究者の所属する国立国際医療研究センター研究所で保管している韓国の三日熱マラリア(Pv)検体(11検体)、フィリピン(パラワン島)の検体(18検体)、その他、同部局で保管する輸入マラリア患者検体(20検体)を用いた。

(倫理面への配慮)

患者からの検体の採取の際は、必要なインフォームド・コンセントの取得や、事前の倫理審査など、適切な作業と研究内容の正当性を確実に保つことに最大限の注意を払った。また赤血球に感染したマラリア原虫の遺伝子解析は行ったが、宿主であるヒトの遺伝子解析は行っていないので、文部科学省・厚生労働省・経済産業省が共同作成した「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に抵触する研究は行っていない。

2) 患者血球からPvDNAを抽出し、PCR法で検体のmtDNA全領域(約6Kb)を増幅後、

DNA シークエンサーを用いて mtDNA 全塩基配列を決定した。

3) GenBank データベースに報告されている世界各地の Pv 検体(約 280 検体)の mtDNA 塩基配列情報と共に、近隣結合法、及びハプロタイプネットワーク法を用いて分子系統樹を作成した。

### C. 研究結果

Pv mtDNA 全塩基配列に基づく分子系統解析の結果、世界の Pv 集団は、それぞれの流行地域毎のクラスターに分かれることが明らかとなった。1) 韓国の Pv 集団は、遺伝的に異なる2つの集団からなることが本研究ではじめて明らかとなった。そしてそれら2つの Pv 集団は、それぞれ遺伝的に異なる2つの中国南部の Pv 集団と近縁であった(Iwagami ら, Malar J, 2010)。2) フィリピンの Pv 検体(3検体)は、タイをはじめとするインドシナ半島の Pv 集団と遺伝的に近縁であることが明らかとなった。3) 分担研究者の部局で保管する輸入三日熱マalaria患者検体は、全て患者の渡航先由来の Pv 集団を含むクラスターに含まれた。

### D. 考察

結果1)より、韓国の Pv 集団の起源は中国南部の Pv 集団にあると推定された。恐らく同地域間でのヒトの移動に伴って Pv が拡散したと推察された。結果2)より、フィリピンのパラワン島の Pv は、地理的に近いインドネシアの Pv よりも、インドシナ半島の Pv と遺伝的に近縁であったことから、船によるヒトの移動が盛んになってから同地域にもたらされた可能性が示唆された。なお GenBank に登録されているフィリピン株(1検体)は、パプアニューギニアの Pv 集団と近縁であったことから、フィリピンの Pv 集団はヘテロジニアスな集団である可能性が高いと推察された。結果3)より、複数の流行地域を渡航して感染地が不明な患者でも、感染地推定が可能であると考えられた。実際、そのような患者由来の2検体を解析し、患者の渡航先と矛盾のない感染地の推定結果が得られた。

### E. 結論

韓国やフィリピンとの国際医学協力研究をとおして、Pv mtDNA 塩基配列に基づく分子系統解析を行い、アジアに流行する現生 Pv 集団は生物地理学的に非常に多様な集団であることが明らかとなった。また同集団は、ヒトの移動に伴って世界中に拡散したと推定され、地球規模保健課題である「人口移動と再興感染症の拡散」という問題を包含していることが明らかとなった。さらに本解析方法を応用することで、三日熱マalaria患者の臨床管理に役立つ情報を医師に提供出来ることが明らかになり、わが国の厚生労働行政上問題となる輸入マalariaの管理に関して、有用な解析手法であることが渡航医学的にも明らかとなった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Moritoshi Iwagami, Seung-Young Hwang, Megumi Fukumoto, Toshiyuki Hayakawa, Kazuyuki Tanabe, So-Hee Kim, Weon-Gyu Kho, Shigeyuki Kano. Geographical origin of *Plasmodium vivax* in the Republic of Korea: haplotype network analysis based on the parasite's mitochondrial genome. Malaria Journal 9:184, 2010.

#### 2. 学会発表

1) Moritoshi Iwagami, Megumi Fukumoto, Weon-Gyu Kho, Pilarita T. Rivera, Shigeyuki Kano. Phylogeographic Analysis of Mitochondrial DNA Sequences of *Plasmodium vivax* and its Application to Travel Medicine. 第8回アジア太平洋渡航医学会大会, 奈良新公会堂 (2010年10月20-23日)

2) 石上盛敏, 福本恵, Weon-Gyu Kho, 狩野繁之. ハプロタイプネットワーク法による韓国の三日熱マalaria原虫の起源の推定. 第79回日本寄生虫学会大会, 大雪クリスタルホール(2010年5月20-21日)

### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)

分担研究報告書

ワクチン分子の無細胞系合成システムの確立

分担研究者 坪井敬文 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター 教授

研究要旨： コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いることにより、熱帯熱マラリア原虫遺伝子をコドン改変することなく原虫ゲノムワイドなプロテインアレイを作製した。この中からメロゾイト期に特異的な組換えタンパク質 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結果、機能未知の原虫分子の中に、マラリア免疫ヒト血清と反応有する分子を検出することに成功した。さらにこれらの内、PfMSPDBL1 と呼ばれている機能未知分子がマラリア赤血球期ワクチン候補となりうるか検討し、PfMSPDBL1 は熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入に重要な役割を果たすこと、さらに新規赤血球期ワクチン候補となる可能性が示唆された。以上の結果から、本法のハイスループット免疫スクリーニング系としての有用性が確認された。

A. 研究目的

マラリア撲滅が 2007 年に再度宣言されて依頼、マラリアワクチン開発は緊急の課題として再認識された。そのためには、既知のワクチン候補のみの研究では限界に達しており、新たなワクチン候補分子の探索が、緊急の課題となっている。申請者らは、マラリア原虫組換えタンパク質の合成に優れているコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いて熱帯熱マラリア原虫のゲノムワイドに組換えタンパク質を発現し、その中から新規抗原を同定することを目的に本研究を実施した。

B. 研究方法

1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて、熱帯熱マラリア原虫タン

パク質の内、マラリアゲノム情報データベース (PlasmoDB) より、メロゾイト期にのみ発現が示唆されている遺伝子を選択し、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて熱帯熱マラリア原虫赤血球期プロテインアレイを作製した。これを用いて、以下のスクリーニングを実施した。

2) ハイスループット抗原抗体アッセイ

これらのプロテインアレイとマラリア感染者血清との抗原抗体反応を検出するために、これまでに確立したアルファスクリーン法を応用した。

3) タイ国におけるマラリア流行地からの血清試料の入手

なお、用いたマラリアに対する防御免疫を保有していると考えられる血清はタイ国カンチャナブリ県のマラリア流行地コンモンタ村において一

昨年度入手し、また防御免疫を保有していないと考えられる血清は、タイ国ターク県のマラリア患者から入手した。

(倫理面への配慮)

タイ国におけるマラリア患者血液の採取に当たってはタイ国保健省の許可を得、患者への説明を十分行なった上で同意を得て実施した。また、本血清試料の利用は愛媛大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の許可を得ている。

### C. 研究結果および考察

#### 1) 熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期組換えタンパク質の合成

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて昨年度樹立した熱帯熱マラリア原虫メロゾイト期分子114種類からなるプロテインアレイを免疫スクリーニングに用いた。

#### 2) ハイスループット抗原抗体アッセイの実施

昨年度、上記のプロテインアレイを用いて、タイのコンモンタ村から得られた熱帯熱マラリアに対する防御抗体を含有している可能性の高いヒト免疫血清22人分と、タイ国ターク県のマラリア患者から入手した患者血清22人分の反応性をアルファスクリーニング法を用いて検討し、患者血清よりも免疫血清と有意に高く反応した防御抗体の誘導に関連する可能性のある分子が7種類選択された。その内訳は、これまでにワクチン候補抗原として研究されてきた既知分子が5種類、

機能未知の分子が2種類であった。そこで今年度は、これらの機能未知分子の内、PfMSPDBL1と呼ばれている分子がマラリア赤血球期ワクチン候補となりうるかを検討した。PfMSPDBL1は一次構造上、既知の赤血球結合タンパク質EBA175等の分子が有するDBL (Duffy Binding Like)ドメインに類似したドメインを有するため、赤血球侵入において重要な機能を果たすことが予測された。全長および部分長PfMSPDBL1組換えタンパク質をコムギ胚芽無細胞系により合成し動物抗血清を作製した。これら抗血清を用いた間接蛍光抗体法により、PfMSPDBL1は赤血球への侵入型であるメロゾイト表面への局在が確認された。また、原虫のPfMSPDBL1はヒト赤血球表面に結合し、さらに抗PfMSPDBL1抗体は、培養熱帯熱マラリア原虫の赤血球への侵入を阻害することが明らかとなった。以上の結果から、PfMSPDBL1は熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入に重要な役割を果たすこと、さらに新規赤血球期ワクチン候補となる可能性が示唆された。以上の結果から、本法のハイスループット免疫スクリーニング系としての有用性が確認された。

#### 3) 今後の課題

同定されたその他の新規の抗原に関しては、PfMSPDBL1同様個別の研究を進めてゆき、ワクチン活性の同定にすすめてゆく予定である。

### D. 結論

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いたハイスループット抗原抗体反応スクリーニングにより、新規マラリアワクチン候補抗原のスクリーニングがゲノムワイドに可能となると考えられた。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: a key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. *Acta Trop.* 2010, 114: 171-176.
- 2) Miyata T, Harakuni T, Tsuboi T, Sattabongkot J, Kohama H, Tachibana M, Matsuzaki G, Torii M, Arakawa T. *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, linked to cholera toxin B subunit induces potent transmission-blocking immunity by intranasal as well as subcutaneous immunization. *Infect Immun.* 2010, 78: 3773-3782.
- 3) Blagborough AM, Yoshida S, Sattabongkot J, Tsuboi T, Sinden RE. Intranasal and intramuscular immunization with baculovirus dual expression system-based Pvs25 vaccine substantially blocks *Plasmodium vivax* transmission. *Vaccine.* 2010, 28: 6014-6020.

##### 2. 学会発表

- 1) Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Tachibana M, Miura K, Varma S, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T. Identification of novel blood-stage vaccine candidates against *Plasmodium falciparum* by high-throughput immunoscreening. Adaptive and Innate Immune Responses to Neglected Tropical Diseases, San Diego, USA, January 9-11, 2010.
- 2) Miura K, Takeo S, Sakamoto H, Kaneko T, Varma S, Torii M, Sirima SB, Tsuboi T. Identification of *Plasmodium falciparum* blood-stage potential vaccine candidates: high-throughput immunoscreening approach with Burkina Faso children sera. Adaptive and Innate Immune Responses to Neglected Tropical Diseases, San Diego, USA, January 9-11, 2010.
- 3) Takeo S, Sawasaki T, Torii M, Sattabongkot J, Endo Y, Tsuboi T. Functional production of malarial parasites' proteins with wheat germ cell-free system. Keystone Symposium, Structural Genomics: Expanding the Horizons of Structural Biology, Breckenridge, USA, January 8-13, 2010.

- 4) Tsuboi T, Tachibana M, Takeo S, Sattabongkot J, Wu Y, Torii M. Sexual stage parasites and transmission-blocking antibodies. Keystone Symposium, Malaria: New Approaches to Understanding Host-Parasite Interactions, Copper Mountain, USA, April 11-16, 2010.
- 5) Chen JH, Jung JW, Wang Y, Lu F, Ha KS, Tsuboi T, Han ET. Evaluation of putative immunogenic proteins from vivax malaria blood stage by high-throughput screening assays. Keystone Symposium, Malaria: New Approaches to Understanding Host-Parasite Interactions, Copper Mountain, USA, April 11-16, 2010.
- 6) Tsuboi T, Tachibana M, Takeo S, Sattabongkot J, Wu Y, Torii M. (Invited speaker) Wheat germ cell-free system-expressed Pfs230 is an effective transmission-blocking vaccine candidate antigen. 12th International Congress of Parasitology, Melbourne, Australia, August 16-20, 2010.
- 7) Miura T, Takeo S, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. Erythrocyte proteome screening for interaction partners of malarial merozoite RhopH complex. 12th International Congress of Parasitology, Melbourne, Australia, August 16-20, 2010.
- 8) Ito D, Han ET, Takeo S, Thongkukiatkul A, Otsuki H, Torii M, Tsuboi T. Characterization of putative rhoptry neck protein 3 (PfRON3) in *Plasmodium falciparum* merozoite. 12th International Congress of Parasitology, Melbourne, Australia, August 16-20, 2010.
- 9) Arumugam TU, Takeo S, Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Thompson J, Healer J, Crabb B, Cowman A, Torii M, Tsuboi T. A new Pf merozoite micronemal protein is a novel blood-stage vaccine candidate antigen. 12th International Congress of Parasitology, Melbourne, Australia, August 16-20, 2010.
- 10) Sakamoto H, Takeo S, Kaneko T, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T. A novel blood-stage malaria vaccine candidate with human erythrocyte binding capacity. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 7-10, 2010.
- 11) Arumugam TU, Takeo S,

- Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.  
Wheat germ cell-free system facilitated the identification of a novel malaria vaccine candidate.  
The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. September 7-10, 2010.
- 12) Miura T, Takeo S, Otsuki H, Sawasaki T, Endo Y, Torii M, Tsuboi T.  
RhopH complex from mouse malaria parasite interacts with erythrocyte calmyrin.  
ASTMH 59th annual meeting, Atlanta, USA, November 3-7, 2010.
- 13) Arumugam TU, Takeo S, Thonkukiatkul A, Miura K, Otsuki H, Zhou H, Long CA, Sattabongkot J, Torii M, Tsuboi T.  
Identification of a novel blood stage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum*.  
ASTMH 59th annual meeting, Atlanta, USA, November 3-7, 2010.
- 14) 坪井 敬文 (シンポジスト)  
マalariaワクチン研究の最前線-我が国発の技術による国際貢献  
厚生労働省主催、平成 21 年度 地球規模保健課題推進研究事業シンポジウム、東京、3/30、2010。
- 15) 原國哲也、宮田 健、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘 真由美、鳥居本美、李 長春、渡部久実、松崎吾朗、新川 武  
酵母 *Pichia pastoris* 発現ネズミマalariaアメロゾイト表面蛋白質 MSP1-19 のワクチン効果  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 16) 新川 武、宮田 健、池原 歩、原國哲也、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘 真由美、鳥居本美、松崎吾朗  
新たなワクチンプラットフォーム創製のための三部構成四価免疫賦活複合体 (TITs)  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 17) 宮田 健、原國哲也、池原 歩、坪井敬文、Sattabongkot Jetsumon、橘真由美、鳥居本美、松崎吾朗、新川武  
新たなワクチンプラットフォーム創製のための三部構成五価免疫賦活複合体 (TIPs)  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 18) 橘真由美、石野智子、Jenwithisuk Rachaneeporn、Kangwanransan Niwat、横内 ゆき、Sattabongkot Jetsumon、坪井敬文、鳥居本美  
コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を用いた三日熱マalaria伝搬阻止ワク



- チン候補抗原 Pvs230 の作製  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 19) Jenwithisuk Rachaneeporn、Kangwanransan Niwat、橘真由美、石野智子、坪井敬文、鳥居本美  
A novel protein is targeted to the crystalloids of *Plasmodium yoelii* ookinetes  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 20) 大槻 均、入子英幸、石野智子、金子 修、福本宗嗣、坪井敬文、鳥居本美  
ネズミマラリア原虫赤血球結合タンパク(EBL)の細胞内輸送ドメインの機能解析  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 21) 伊藤大輔、韓 銀澤、竹尾 暁、Thongkukiatkul Amporn、大槻 均、鳥居本美、坪井敬文  
熱帯熱マラリア原虫メロゾイト rhoptry neck protein 3 の性状解析  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 22) 北村 圭、熊谷 貴、Bentum Bethel K、三田村俊秀、坪井敬文、太田信生  
熱帯熱マラリア原虫におけるオートファジーの役割  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 23) 金子 明、Taleo George、Chaves Luis F、Perlmann Hedvig、江藤秀顕、竹尾 暁、橘 真一郎、Troye-Blomberg Marita、坪井敬文、Drakeley Chris、田邊和祐  
島嶼マラリア根絶 10 年後の三日熱マラリア再燃  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 24) 大前比呂思、伊藤 誠、中澤 港、亀井喜世子、Bakotee Bernard、Suraj Eka、長岡史晃、坪井敬文、木村英作  
ソロモン諸島のマラリア調査における尿診断法の試み  
第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市、5/20-21、2010。
- 25) 坪井敬文(招待講演)  
マラリアワクチン研究の最前線  
第 9 回四国免疫フォーラム、東温市、6/19、2010。
- 26) 坪井敬文(招待講演)  
マラリアと人類:歴史は物語る  
第 114 回日本医学放射線学会中国・四国地方会、今治市、6/26、2010。
- 27) 坂本寛和、竹尾 暁、坪井敬文  
熱帯熱マラリア原虫メロゾイトの機能未知抗原 PfMSPDBL1 は赤血球侵入に関与するか?  
第 18 回分子寄生虫学ワークショップ、草津町、8/2-5、2010。

戸市、12/7-10、2010。

- 28) 埜本竜宏、竹尾 暁、坪井敬文  
熱帯熱マラリア原虫メロゾイト抗原タンパク質 H103 の機能解明に向けて  
第18回分子寄生虫学ワークショップ、  
草津町、8/2-5、2010。
- 29) Thangavelu U. Arumugam、竹尾 暁、  
Amporn Thonkukiatkul、三浦憲豊、  
大槻 均、Carole A Long、Jetsumon  
Sattabongkot、鳥居本美、坪井敬文  
マイクロネームに局在する新規熱帯  
熱マラリア赤血球期ワクチン候補抗原  
の同定  
第 9 回分子寄生虫・マラリア研究フォー  
ラム、長崎市、10/8-9、2010。
- 30) 加藤 晶、竹尾 暁、Jetsumon  
Sattabongkot、鳥居本美、坪井敬文  
熱帯熱マラリア原虫の各侵入型原虫  
における新規内膜複合体関連分子の  
同定  
第 9 回分子寄生虫・マラリア研究フォー  
ラム、長崎市、10/8-9、2010。
- 31) 三浦豊和、竹尾 暁、坪井敬文  
赤血球寄生期マラリア原虫の RhopH  
タンパク質複合体：相互作用する宿  
主赤血球分子の探索  
第 33 回日本分子生物学会年会、神  
戸市、12/7-10、2010。
- 32) 埜本竜宏、竹尾 暁、坪井敬文  
マラリア原虫メロゾイトにおける抗原タ  
ンパク質 H103 の機能解明  
第 33 回日本分子生物学会年会、神

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

赤痢アメーバの病原機構の解明

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

**研究要旨** 赤痢アメーバ症はアジア・アフリカ等の開発途上国を中心として蔓延する重要な腸管寄生原虫症である。本研究は赤痢アメーバの特殊な病原機構と代謝の一端を明らかにすることを目的としている。本年度は、昨年度に引き続き、赤痢アメーバの酸化ストレスに対する応答を、エネルギー代謝等を中心に解析した。

**A. 研究目的**

赤痢アメーバ症（アメーバ赤痢）は熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心として世界の人口の約1%が感染する腸管感染症である。一方、我が国を含む一部先進諸国においても、知的障害者および男性同性愛者において重度の感染浸淫を引き起こしている。赤痢アメーバの遺伝子情報は、全ゲノムの読了（Lofus Nature 2005）により明らかにされ、本原虫の病原性、寄生性等の重要な生物機構の青写真が明らかにされつつある。しかしながら原虫が生存の過程で曝される様々なストレスに対する応答等に関する個別の研究に関しては、依然未解明なものが多く、オミクス研究に代表されるポストゲノムアプローチが不可欠である。

我々は赤痢アメーバのエネルギー産生の解明に主眼を置いて研究を継続している。赤痢アメーバは一般の原核・真核生物と異なり、主要な抗酸化物質であるグルタチオン並びに、グルタチオン生合成並びに代謝の能力を持たず、NADPH 依存性酸化還元酵素などに代表される特殊な酸化ストレス防御機構を有している。しかしながら、酸化ストレスが赤痢アメーバの中心代謝に与える影響に関してはほとんど未解明である。そこで本研究では、酸化ストレスが赤痢アメーバの中心代謝に与える影響をトランスクリプトーム解析による網羅的遺伝子発現

プロファイリングにより解析した。

**B. 研究方法**

**1. 培養**

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6 (Louis Buddy Diamond の分離による) の培養は常法の無菌培養法に従った。

**2. トランスクリプトーム解析**

Affymetrix 社製のカスタム合成された *E. histolytica*/*E. invadens* マイクロアレイを用いた。プローブのデザイン、cRNA の作成、ハイブリダイゼーション、スキャンなどは常法に従った。トリプリケートで得られたデータの優位性は ANOVA にて検定した。

（倫理面への配慮）本研究に関わる病原体の取扱に関する許可は当該研究機関にて得られている。

**C. 研究結果**

**1. 酸化ストレスによる遺伝発現変化**

赤痢アメーバの栄養型をシステム枯渇の環境で 3, 6, 12, 24, 或は 48 時間培養を行ったところ、9327 遺伝子のうち 290 遺伝子が少なくとも 1 点以上で 3 倍以上の発現変化を示した (3.1%)。290 遺伝子のうち、129 遺伝子は発現上昇を示し、167 遺伝子は発現抑制を示した。残り 6 遺伝子は時点により上昇あるいは下降を示した (図 1)。

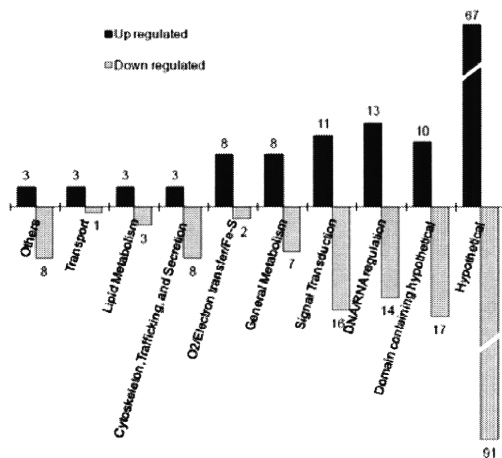


図1 トランスクリプトーム解析により3倍以上変化の見られた遺伝子の分類

## 2. 発現変化した遺伝子の分類

129の上昇遺伝子のうち39%にあたる50遺伝子はGO(gene ontology)分類により、分類可能であった。これらは、シグナル伝達、代謝、DNA/RNA調節、電子伝達、ストレス応答、輸送、トラフィック/分泌/細胞骨格などに分類された(図1)。残りの77遺伝子(59)は”hypothetical protein”或は保存された領域を有するタンパク質と分類された。抑制された167遺伝子のうち60(38%)はGO分類された。一方108遺伝子(62%)は”hypothetical protein”或は保存された領域を有するタンパク質と分類された。

## 3. qRT-PCR法によるトランスクリプトームデータの確認

トランスクリプトーム解析の結果を確認することを目的として、発現上昇の見られた2遺伝子(EHI\_173950; EHI\_138480)、発現低下の見られた2遺伝子(EHI\_045340; EHI\_052890)、ならびに変化のなかった1遺伝子(EHI\_056690)に関してqRT-PCRによる確認を行った。トランスクリプトームのデータとqRT-PCRのデータは良く整合していた(表1)。

Verification of the array data by qRT-PCR

Common Name	Accession Number	Fold Change				
		3h	6h	12h	24h	48h
Major facilitator superfamily (MFS) transporter	XM_647419	2.0 (4.1)	12.8 (14.6)	7.2 (9.9)	4.2 (4.7)	2.3 (2.6)
Iron sulfur flavoprotein (IF)	XM_650038	1.8 (3.8)	4.4 (6.6)	14.9 (9.8)	5.5 (5.4)	2.8 (4.2)
NADPH-dependent oxidoreductase (ENNOZ)	XM_648481	-3.0 (-1.9)	-3.0 (-1.9)	-6.0 (-3.0)	-6.4 (-10.6)	-7.8 (8.3)
Hypothetical protein	XM_645369	-2.2 (-1.1)	-6.4 (-8.3)	-12.9 (-11.1)	-3.4 (-3.0)	-2.7 (-2.6)
RNA polymerase II 15-kDa subunit	XM_642999	1.9 (1.4)	4.2 (1.2)	1.1 (1.2)	5.3 (1.1)	1.3 (1.2)

表1 マイクロアレイ解析とqRT-PCRデータの整合性

## 4. システイン飢餓の含硫アミノ酸代謝関連遺伝子に対する影響

図2に含硫アミノ酸の代謝概要を示す。図3に示すように、一つの例外を除き、含硫アミノ酸代謝に関与すると現時点で強く示唆・予測される遺伝子の>3倍の発現変化は見られなかった。フォスフォセリンアミノ転移酵素(phosphoserine amino transferase: PSAT)は3-phosphohydroxypyruvateとL-phosphoserineの両方向性の反応を触媒する酵素であり、解糖経路からのセリン生合成に関与するリン酸化経路と呼ばれる経路の第二段の酵素である。PSATの発現は48時間後に3.3倍して減少していた。3倍の変化には満たないが、methionine adenosyl transferase (MAT)や phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH)がそれぞれシステイン枯渇の早期、後期にそれぞれ変化していることが示された。

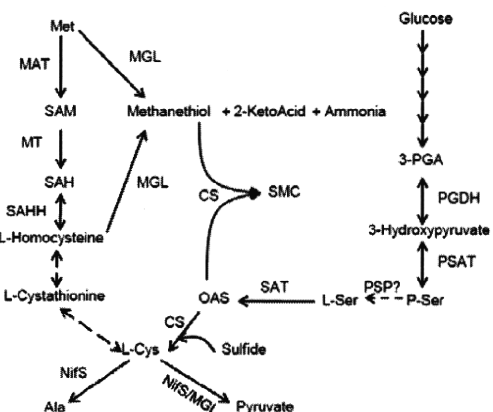


図2 赤痢アメーバにおける含硫アミノ酸代謝の概要

## ノ酸代謝経路

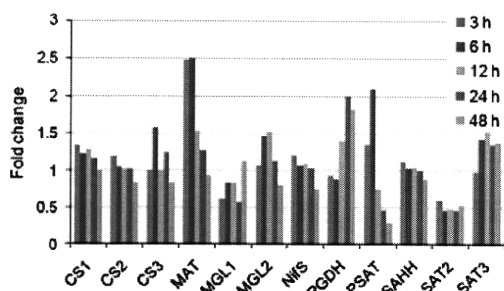


図3 シス테인飢餓による含硫アミノ酸代謝関連酵素遺伝子発現への影響

## D. 考察及び結論

酸化ストレスへの応答は原虫の宿主内でのサバイバルに必須である。原虫は組織侵入の際に高い酸化ストレスに暴露される。我々は本研究においてシス테인飢餓にともなう酸化ストレスに伴う原虫の遺伝子発現調節を網羅的に理解することを目的として、トランスクリプトーム解析を開始した。我々の予想に反して、シス테인飢餓にも関わらず、含硫アミノ酸代謝経路のほとんどの遺伝子は転写レベルの調節を受けなかった。我々のこれまでのメタボローム解析ではシス테인飢餓で解糖経路などが大きく影響を受けることが示されており、[Husein, J Biol Chem, 2010]。一方他種生物では、シス테인の availability は細胞内含硫アミノ酸代謝に大きく影響することが知られている [Lee J-in, 2008]。例えば、HepG2/C3A 細胞では、シス테인飢餓により cysteinyl-tRNA synthetase, glutamate-cysteine ligase, L-cystine-glutamate transporter, cystathionine  $\gamma$ -lyase, glutamate-cysteine ligase などの発現が上昇し、3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate synthase と sulfite oxidase の発現が抑圧されることが知られている [Lee J-in, 2008]。従って、赤痢アメーバのシス테인飢

餓に対する遺伝子発現応答は特殊であると言える。

嫌気原虫におけるエネルギー合成系は哺乳動物と大きく異なり、本研究により明らかにされた、酸化ストレスによる中心代謝経路の調節機構は前例がない。したがって本研究成果は、赤痢アメーバに対する新規創薬の観点からも、重要な示唆を与えたと言える。

## E. 健康危険情報

該当せず

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (i) Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsue, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Two Atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. J. Biol. Chem., 285, 26889-26899.
- (ii) Yousuf, M. A., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2010) Localization and targeting of unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. Eukaryot. Cell 9, 926-933.

### 2. 学会発表

- (i) J Sato, D., Husain, A., Jeelani, G., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolic analysis of the human enteric parasite *Entamoeba histolytica*: Discovery of unique pathways and potential targets for chemotherapeutics. Metabolomics 2010, June 27-July 1, 2010, Amsterdam, The Netherlands

- (ii) Jeelani, G., Sato, D., Jusain, A., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomics of parasite differentiation: metabolomic profiling of the human enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* revealed activation of unpredicted pathways during differentiation of the proliferative into dormant stage. Metabolomics 2010, June 27-July 1, 2010, Amsterdam, The Netherlands

なし

**G. 知的所有権の出願・登録状況**

1. 特許取得  
該当せず。
2. 実用新案登録  
該当せず

## フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）

分担研究者 木村英作 愛知医科大学医学部教授

### 研究要旨

(1) 頻回の集団治療（MDA）を受けたスリランカの2村において、尿 ELISA と ICT test の感度を比較した。Sentinel group とされる 10 歳以下の小児において、前者はより高い感度を示した。尿 ELISA は感染率が低い post-MDA stage においても有用であることが再確認された。

(2) フィラリア症が存在しないとされていた地域の2村（スリランカ）で尿 ELISA による疫学調査を実施した。感染率は共に 2% 以下であったが、2村で 10 歳以下の小児の感染パターンが大きく異なるという興味深い結果が得られた。追跡を要する。

(3) 尿を検体とするビーズ法（目視判定可能）と尿 ELISA をバングラデシュで比較検討した。両者とも十分な感度と特異度を示し、住民にも良く受け入れられた。

(4) フィラリア感染蚊を効率よく発見するための LAMP 法を開発した。

### A. 研究目的

本研究は、2020 年までに世界からリンパ系フィラリア症を制圧するという WHO の計画に寄与することを目的とする。流行地では、年 1 回、5 回の集団治療（MDA）を実施することになっているが既にそれを完了した国が少なくない。Post-MDA 期にはフィラリア症の〈征圧確認〉と〈再燃の早期発見〉が重要で、いずれの場合も非常に低い感染レベルを見逃さない感度の高い診断法が必須となる。

我々は尿を検体とする免疫診断法（尿 ELISA）を開発したが、引き続きその有用性を流行地の現場において確認する作業を行っている。また、我々は目視判定が

できる新たな尿診断法（ビーズ法）を開発したが、バングラデシュにおける野外応用を目指した基礎研究（感度テストなど）を実施した。さらにビーズ法を疫学調査に応用した。

実験室の研究として、フィラリア感染蚊を発見する LAMP 法をほぼ完成させた。

### B. 研究方法

#### 1. Post-MDA 期における尿 ELISA と ICT test の比較（スリランカ）

尿 ELISA の有用性を確認するため、MDA が 5～13 回実施された Unawatuna, Hamugewatta の 2 村で、現時点で最も信頼されている ICT test（抗原検出キット）

と比較研究を行った。

## 2. フィラリア症非流行地における尿 ELISA の応用 (スリランカ)

非流行地でも陰嚢水腫・象皮病が発見される。通常、流行地住民の移動によるものであるが、例数が多い時には流行の有無を検証する必要がある。このような地域にある Ratunapura 村 (R 村: 子供と若者が検査対象) と Belihul-oya 村 (B 村: 全住民が対象) で尿 ELISA を実施した。

## 3. バングラデシュにおけるビーズ法の有用性の検討 (尿 ELISA、ICT との比較)

尿診断法をバングラデシュに応用することを目的に、基礎実験として尿 ELISA およびビーズ法の感度、特異性を検討した。さらに、小学生を対象とする感染調査を実施し尿診断と ICT test の結果を比較した。

## 4. LAMP 法による媒介蚊調査の簡便化

フィラリアの伝搬が起きているか否かの判定に、多数の媒介蚊を解剖してフィラリア幼虫を検出する方法がある。手技が煩雑で時間を要するため、近年 PCR 法が導入された。我々はさらなる簡便化をめざして LAMP 法の開発を試みた。

### (倫理面の配慮)

本研究は、愛知医科大学倫理委員会の審査を経て実施されている。スリランカにおける共同研究者は、その所属機関(ル

フナ大学医学部)において同様の審査・承認を得ている。バングラデシュでの研究は Bangladesh Medical Research Council (BMRC) の承認を得た。被検者には十分な説明を行い同意を得ている。

## C. 研究結果

### 1. 尿 ELISA と ICT test の比較

2 村で計 1,300 人以上が尿 ELISA と ICT による検査を受けた。結果を表 1 に示す。

表 1	尿 ELISA	ICT
陽性者数/検査数*	285/1360	51/1317
陽性率 (%)	21.0	3.9
陽性者数/検査数**	5/192	1/180
陽性率 (%)	2.6	0.6

\*全年齢

\*\*10 歳以下のみ

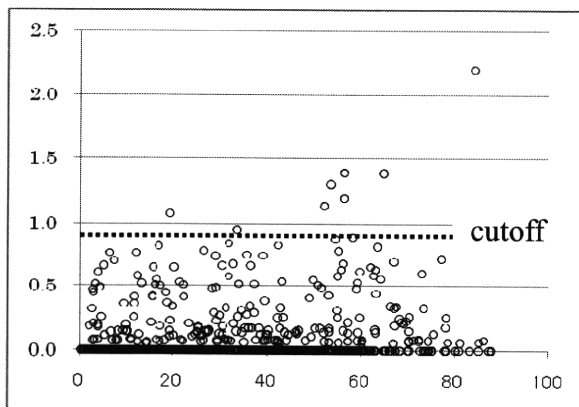
尿 ELISA は、新しい感染(或いは抗原曝露)を示す 10 歳以下の陽性率において ICT test より高値をしめした。

### 2. 非流行地における尿 ELISA の応用

アンケート調査と GIS による分析の結果、非流行地とされる地域内に陰嚢水腫の罹患率が高い村が発見されたため尿 ELISA を実施した。R 村で 817 人中 13 人 (1.6%)、B 村では 688 人中 8 人 (1.2%) が陽性であった。興味深いことに、R 村では陽性者の 6/13 (46%) が 10 歳未満なのに対し、B 村では 0/8 (0%) であった(最年少陽性者は 19 歳)。図 1 に抗体価の分布を示す。

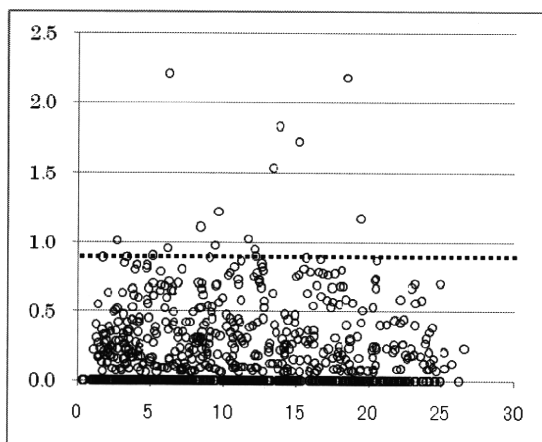


図 1-a Belihul-oya 村



縦軸：抗体価 (log 値)、横軸：年齢

図 1-b Ratunapura 村



### 3. ビーズ法/尿 ELISA の検討

バングラデシュにおいて尿診断法の感度、特異度を検討した (表 2)。

Gold Std.*	感度 (%)	
	尿 ELISA	ビーズ法
N = 105	84.8	81.0

\*ICT(+) サンプル

Gold Std.**	特異度 (%)	
	尿 ELISA	ビーズ法
N = 104	100	100

\*\*ICT(-) サンプル

Post-MDA 期の小学校で 5-10 歳の学童 319 人を対象に尿 ELISA、ビーズ法、ICT test の結果を比較した。陽性率は、尿 ELISA 2.2% (7/319)、ビーズ法 1.6% (5/319)、ICT 0.3% (1/319)であった。

### 4. 媒介蚊のフィラリア感染を検出する LAMP 法の開発

様々な数のネッタイエカ成虫プールにバンクロフト糸状虫マイクロフィラリア (mf) 1 匹を加えてホモジェネートし、DNA 抽出後に PCR、LAMP を実施した。

両方法で 1 mf/40 mosquitoes までの検出が可能となった。

### D. 考察

#### 尿 ELISA vs. ICT

ICT test は感度、特異度が高く 10 分間でフィラリア抗原を検出できることから診断の世界標準とみなされることがあるが、almighty ではない (例えば +/- のみの定性検査である)。我々は、post-MDA 期にはむしろ抗体検出が有利と考えている。今回の比較実験で、尿 ELISA は ICT よりはるかに多くの感染者を検出することが確認された (再燃の発見に優れている)。

ELISA は技術的に煩雑であるが、定量的データを得られることから情報量が多く、フィラリア伝搬の解析に有利である。

#### 非流行地での尿 ELISA の応用

“非流行地”の中に隠れた流行地が存在する可能性は少なくない。しかし、感

染がない地域の住民は採血を好まないことがある。今回そのような状況下での調査で、尿 ELISA が有用であることが示された。R 村では 10 歳未満の小児に抗体陽性者が発見されたが、限局的な伝搬が起きているのかもしれない。疑陽性の可能性も含めて今後検討する必要がある。

### ビーズ法の野外応用

ビーズ法の感度、特異度が尿 ELISA と同様であったこと、学童の調査で ICT より高い陽性率が得られたことより、疫学調査に応用できることが示された。今後は、現地人スタッフによる目視判定を行うなど、より実地的な研究を行う必要がある。

### E. 結論

- (i) Post-MDA 期における尿 ELISA の有用性が ICT test との比較で確かめられた。
- (ii) 尿 ELISA は非流行地でも住民に受け入れられるので、隠れた流行地の発見に利用できる。
- (iii) ビーズ法が、十分に野外応用できることが示された。
- (iv) フィラリア感染蚊を発見するための LAMP 法がほぼ完成した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

(1) The Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: History and achievements with special reference to annual

single-dose treatment with diethylcarbamazine in Samoa and Fiji. Kimura E. *Tropical Medicine and Health* 39(1); 2011: 1-14

#### 2. 学会発表

(1) Diagnosis of a mosquito-borne disease: Use of urine samples for detecting filarial infection in a monitoring program after successful mass drug administration. Kimura E, Itoh M, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Samad MS, Takagi H, Nagaoka F, Moji K, Hossain M. The 2nd International Conference on Climate Change and Neglected Tropical Diseases. 29-30 Sep, 2010 (Dhaka, Bangladesh).

(2) Evaluation of two monitoring schemes after one year of community home-based care (CHBC) programme of morbidity control in lymphatic filariasis in three suburbs of Matara, Sri Lanka. Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, Kimura E. The XIIth International Congress of Parasitology. 15-20 Aug, 2010 (Melbourne, Australia).

(3) Effects of repeated rounds of anti-filarial Mass Drug Administration (MDA) with diethylcarbamazine (DEC) plus albendazole on soil transmitted helminths (STHs) in Sri Lanka. Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, Kimura E. The XIIth International Congress of Parasitology. 15-20 Aug, 2010 (Melbourne, Australia).

(4) A rapid assessment procedure (RAP) to assess distribution of lymphatic filariasis

using geographical information systems (GIS). Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, Kimura E. The XIIth International Congress of Parasitology. 15-20 Aug, 2010 (Melbourne, Australia).

(5) Evaluation of urine-based IgG4 ELISA for detecting lymphatic filarial infection and the development of a visual diagnostic method with urine samples. Kimura E, Itoh M, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Samad MS, Takagi H, Nagaoka F, Moji K, Hossain M. 45th Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases. 10-11 Jan, 2011 (NIH, Tokyo).

(6) 年一回の集団治療が尿中のフィラリア特異的 IgG4 抗体に及ぼす影響：スリランカにおける7年間の追跡調査結果。伊藤誠，Weerasooriya MV, Yahathugoda CT, 高木秀和，Samarawickrema WA, 木村英作. 第66回日本寄生虫学会西日本支部大会. 6-7 Nov, 2010 (岡山大学).

(7) バンクロフト糸状虫リコンビナント抗原 SXP1 の尿診断への応用と評価。伊藤誠，高木秀和，長岡史晃，Weerasooriya MV, Wamae N, 木村英作. 第66回日本寄生虫学会西日本支部大会. 6-7 Nov, 2010 (岡山大学).

(8) Confirming the usefulness of ELISA to detect urinary IgG4 for the diagnosis of lymphatic filariasis in Bangladesh. Samad MS, Itoh M, Moji K, Hossain M, Mondal D, Alam MS, Kimura E. 第66回日本寄生虫学会西日本支部大会. 6-7 Nov, 2010 (岡山大学).

(9) バングラデシュにおける HDL ビーズを用いたリンパ系フィラリア症疫学調査。長岡史晃，Samad MS, 伊藤誠，高木秀和，木村英作. 第66回日本寄生虫学会西日本支部大会. 6-7 Nov, 2010 (岡山大学).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当無し

病原体媒介性節足動物（ベクター）由来生物活性分子の機能探索の結果、マダニの唾液腺より、multiple coagulation factor deficiency 2 様分子ロンギスタチンを分離した。ロンギスタチン遺伝子の発現は宿主への付着時に増強されることから、マダニ吸血行動に関与すると考えられた。組換えロンギスタチンは、宿主の血液凝固を阻害することが示された。また、ロンギスタチン遺伝子の発現を抑制したマダニでは、吸血時に宿主皮下における blood pool の形成が阻害された。これらの知見より、ロンギスタチンはマダニ吸血行動に深く関与することが示唆された。

#### A. 研究目的

本研究では、宿主体内への寄生（内部寄生虫）及び体表への寄生（外部寄生虫）に適応した巧妙な生残戦略を備えていると想定される線虫類と媒介節足動物が産生する遺伝子産物の機能解明を実施する。これによって、線虫及び媒介者の生存・侵入・存続に不可欠な分子機構を阻害することのできる新しい寄生虫感染及び伝搬防除技術を確立する。

#### B. 研究方法

病原体媒介者であるマダニを用いて、マダニが産生する生物活性分子（TBM）の機能を生化学・細胞生物学的及び *in vivo* での内在機能を明らかにするため組換え TBM とマダニ-哺乳類宿主系を用いた解析を行った。

- 1) 国内最優占種であるフタトゲチマダニの TBM をコードする EST データベースよりロンギスタチン遺伝子を分離した。
- 2) 宿主ウサギに付着・吸血させたマダニを経時的に回収し、定量 PCR 法を用いて内在性ロンギスタチンの発現動態を検討した。
- 3) 分離した cDNA 配列のうち、成熟蛋白質をコードする領域をプラスミドベクター（pTrcHisB）に挿入し、大腸菌発現系にて組換えロンギスタチンを作製した。
- 4) 上記の組換え体を精製し、マウスに免疫して抗血清を作製した。
- 5) 吸血したマダニおよびマダニ吸血部位の宿主皮膚組織を固定・包埋して薄切し、免疫組織化学及び免疫蛍光抗体法を用いて、内在性ロンギスタチンのマダニ個体・宿主皮下での局在を、細胞生物学的に検討した。

- 6) ロンギスタチンの血液凝固阻害活性はウシ由来フィブリノゲン標品を用いて実施した。
- 7) ロンギスタチンのプラスミノゲンアクティベーター活性は、ヒト由来プラスミノゲン標品を用いて検討した。
- 8) ロンギスタチンをコードする cDNA より逆転写反応を用いて 2 本鎖 RNA を合成し、マダニ個体へ注入することによって、ロンギスタチン遺伝子の発現が抑制されたノックダウンマダニを作製した。

#### C. 研究結果

- 1) フタトゲチマダニより 156 アミノ酸残基・分子量 17.7kDa からなるロンギスタチンをコードする cDNA を分離した。
- 2) 大腸菌で作製した組換えロンギスタチンを用いてが確認された。
- 3) 定量 PCR による解析の結果、ロンギスタチン遺伝子は、共に吸血開始後より発現が増強されており、吸血開始 96 時間後から吸血完了（飽血）時において最も高い発現レベルを示した。
- 4) 免疫蛍光抗体法を用いて検討したところ、ロンギスタチンの陽性反応は唾液腺腺房内に確認され、さらに、マダニ吸着時に宿主皮下に形成される血液貯蔵部位（blood pool）内にも免疫陽性反応が確認された。
- 5) 組換えロンギスタチンは、フィブリノゲン  $\alpha \cdot \beta \cdot \gamma$  鎖を分解することによって、フィブリン塊の形成を阻害することが確認された。
- 6) ロンギスタチンノックダウンマダニを付着させた宿主においては、皮下の blood pool の形成が阻害されるとともに、ノックダウン