

- Ito, Ayako Yoshida, Tetsuya Hayashi and Haruhiko Maruyama, 45th Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases (Tokyo), 2011.
- 吉田彩子、長安英治、堀井洋一郎、丸山治彦 プタ回虫肺移行期幼虫 cDNA ライブラリーの解析から得られた新規 C-type レクチン 第79回日本寄生虫学会大会 (旭川) ,2010.
- Ayako Yoshida, Nobuo Ohta, Haruhiko Maruyama: Depletion of CD4+CD25 + FOXP3+ regulatory T cells down-regulates parasite clearance during early phase of Plasmodium chabaudi AS infection in A/J mice. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August 22-27, 2010.
- Yoshida A, Nagayasu E, Yoichiro Horii, Naotoshi Tsuji, Hiroshi Yamasaki, Maruyama H: Serological diagnosis of Visceral Larva Migrans with recombinant antigens from Toxocara and Ascaris. 8th Asia-Pacific Travel Health Conference, Nara, Japan, October 20-23, 2010.
- 吉田彩子、堀井洋一郎、丸山治彦. プタ回虫症血清診断用抗原候補分子のフェージディスプレイ法を用いた網羅的検索 第63回日本寄生虫学会南日本支部大会・第60回日本衛生動物学会南日本支部大会 2010.
- Eiji Nagayasu, Ayako Yoshida, Haruhiko Maruyama: Large-scale gene expression analysis of different developmental stages of Strongyloides venezuelensis, a rodent intestinal nematode. 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan, Sep. 7-10, 2010.
- Haruhiko Maruyama, Ayako Yoshida, Eiji Nagayasu: Not only Fish: Japanese Delicacies and Eosinophilia. 8th Asia-Pacific Travel Health Conference, Nara, Japan, October 20-23, 2010.
- 吉田彩子、長安英治、丸山治彦 幼虫移行症の診断における局所液の有用性第63回日本寄生虫学会南日本支部大会・第60回日本衛生動物学会南日本支部大会 (鹿児島市) 2010.
- 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.
- 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.
- 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.
- 遠海重裕、坂元君年、後藤美穂、松本淳、八木欣平、片倉賢、奥祐三郎、藤田修、野崎智義、北潔 「エキノコックスミトコンドリア呼吸鎖複合体 II assembly factor のクローニング」第70回日本寄生虫学会東日本支部大会平成22年11月.
- Kenji Nakanishi. Innate and acquired immunity in expulsion of intestinal nematode. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.8.
- Makoto Matsumoto, Koubun Yasuda, Masato Kubo, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. Basophils play a pivotal role in the expulsion of gastrointestinal nematode Strongyloides venezuelensis. 14th International Congress of

- Immunology, Kobe, 2010.8.
- Koubun Yasuda, Yuki Sasaki, Yuichi Kondo, Makoto Matsumoto, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in the absence of adaptive immune system. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.8.
- Nakahira M, Nakanishi K. Involvement of Gata3 in transcriptional regulation of Il13 gene expression in IL-18-stimulated Th1 cells. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010. 8.
- Koubun Yasuda, Yuki Sasaki, Makoto Matsumoto, Yuuko Taki, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi. IL-33 mediated expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* and *Strongyloides venezuelensis*. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, 2010. 9.
- 中西憲司. IL-1 ファミリーサイトカインと炎症. 第 43 回日本痛風・核酸代謝学会総会、大阪、2010.2.
- 安田好文, 松葉沙織, 善本知広, 弓倉静英, 高城ゆう子, 武藤太一郎, 池田誠宏, 三村治, 中西憲司. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. 第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、北九州、2010.6.
- 松本真琴, 安田好文, 久保允人, 善本知広, 中西憲司. *Strongyloides venezuelensis* の感染防御における好酸球と好塩基球の役割について 第 66 回日本寄生虫学会西日本支部大会、岡山、2010.11.
- 桐木雅史, 林尚子, Muth Sinuon, Doung Socheat, Viroj Kitikoon, 千種雄一, 大前比呂思, 松田肇. カンボジア・クラチェ県におけるメコン住血吸虫症疫学調査. 第 79 回日本寄生虫学会大会 旭川市 2010 年 5 月 20 日~21 日.
- 福原一磨, 桐木雅史, 千種雄一, 尾藤伴行, 井上真理, 中村哲, 松田肇, 石川洋文. ラオス・コーン島村落間ネットワークモデルに基づくメコン住血吸虫症対策の評価. 第 79 回日本寄生虫学会大会 旭川市、2010 年 5 月 20 日~21 日.
- 大前比呂思, 千種雄一, Sy OS, Keang H, Olveda R. 東南アジアの住血吸虫症の超音波検査診断基準の国際的標準化における問題点. 第 70 回日本寄生虫学会東日本支部大会、栃木県壬生町、2010 年 10 月 2 日.
- Ohmae H, Kirinoki M, Suniko LS, Boldeero NP, Viacorte EA, Solon AA, Leonard LR, Leshem E, Chigusa Y. Surveys on newly found endemic foci in Southeast Asian countries 2. The 45th Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases. Tokyo, Japan, January 10-11, 2011.
- Asahi, H., Izumiyama, S., Tolba, M.E., Kwansa-Bentum, B. Differing effects of non-esterified fatty acids and phospholipids on intraerythrocytic growth of *Plasmodium falciparum* in serum-free medium. 第 80 回日本寄生虫学会大会 東京、2011 年 3 月.
- Asahi, H., Genome-wide gene expression of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in different developmental stages of the parasite. ICOPA XII, in Melborun, Australia, August 2010.
- Abe, M., Kimura, S., Fukutomi, H., Asahi, H., Yagita, K., Shirakura, T., Zhao, Seki, T., Nakamura, M., Shiokawa, A., and Tanaka, K. High rate existence of pathogenic protozoa latent infection in long term hospitalized patients, a pilot study at autopsy. ICOPA XII, in Melborun, Australia, August 2010.
- 朝日博子: 熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の赤血球内分化増殖に伴う発現遺伝子の解析, 第 79 回寄生虫学会大会、旭川、2010 年 5 月.

Kwansa-Bentum, B., 朝日博子、熊谷 貴、北村 圭、Anyan, W.K., 太田伸生 : Expression level of Plasmodium falciparum chloroquine resistant transporter gene after exposing parasite to chloroquine in vitro. 第 79 回寄生虫学会大会、旭川、2010 年 5 月.

山崎 浩、川中正憲、荒川京子、斉藤典子、加藤基恵、Ruben Mercado. 南米チリのギンザケに寄生する裂頭条虫属プレロセルコイド. 第 79 回日本寄生虫学会大会、北海道旭川市、2010 年 5 月 20-21 日.

石井 明、田中篤太郎、川路博史、大橋寿彦、道伝 整、山崎 浩. 病理組織標本のミトコンドリア DNA 検査により確定されたアジア型有鉤囊虫症について. 第 79 回日本寄生虫学会大会、北海道旭川市、2010 年 5 月 20-21 日.

西尾福真理子、吉川正英、王寺幸輝、石坂重昭、笠原 敬、三笠桂一、福井 博、久保里美、平 康二、山崎 浩. 2009 年に経験した日本海裂頭条虫症の 5 例. 第 21 回日本臨床寄生虫学会、栃木県下野市、2010 年 6 月 19 日.

山崎 浩、杉山 広、森嶋康之、大前 比呂思、椎木創一、奥山久仁男、国島文史 Racemose 型有鉤囊虫による脳有鉤囊虫症の 1 例. 第 21 回日本臨床寄生虫学会、栃木県下野市、2010 年 6 月 19 日.

荒木 潤、安部正史、白倉哲郎、田中 和生、下間 祐、井廻道夫、森本栄治、中村揚介、山崎 浩. 自然排虫された幼若裂頭条虫の鑑別例. 第 21 回日本臨床寄生虫学会、栃木県下野市、2010 年 6 月 19 日.

安倍正史、木村 聡、白倉哲郎、荒木 潤、山崎 浩、光谷俊幸、太田秀一、諸星利男 九島巳樹、田中和生. 病理解剖

遺体調査で遭遇した寄生虫学的に興味ある 2 症例について. 第 21 回日本臨床寄生虫学会、栃木県下野市、2010 年 6 月 19 日.

Yamasaki H., Kawanaka M, Arakawa K, Kato M., Muñoz V., Sagua Hernan., Castillo D., Mercado R. The origin of Diphyllbothrium latum from Chile based on mitochondrial DNA analysis. 第 12 回国際寄生虫学会議、メルボルン、オーストラリア、2010 年 8 月 15-20 日.

山崎 浩. 寄生虫感染症の遺伝子診断における最近の進歩. 静岡県寄生虫症研究会第 15 回研究総会、静岡県浜松市、2010 年 9 月 11 日.

Mercado R., Yamasaki H., Maulen N., Fredes F., Ramirez C., Gómez H., Cerva J.L., Gil L. C., Castillo D. Diferenciación molecular y morfológica de huevos de Diphyllbothrium de casos humanos y animales de Chile. 第 13 回チリ寄生虫学会国際シンポジウム、サンチアゴ、チリ、2010 年 11 月 18-19 日.

杉山 広. 我が国のアニサキスとアニサキス症：主要原因虫種と患者発生数の解析. 第 151 回日本獣医学会学術集会、府中、2011 年 3 月.

## 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

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 本研究は、顧みられない病気(Neglected tropical disease)のひとつであり、世界人口の約1%に感染し、毎年約11万人を死に至しめる腸管寄生性原虫赤痢アメーバのゲノム・トランスクリプトーム解析により、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ることを目的としている。更に、これらの基盤的理解が予防・治療法の創出につながることを目標としている。最終年度は、病原機構・細胞分化に関係することがこれまでに示唆された遺伝子の機能を今後解明するために不可欠な遺伝学的手法を開発した。更に、細胞分化(嚢子化)過程の制御において重要な働きをする転写因子を同定した。以上、今後の嚢子化過程の制御機構を解析する手法は確立された。

#### A. 研究目的

赤痢アメーバ症は、腸管寄生原虫赤痢アメーバによる感染症で、単細胞性原生生物による感染症の中で、マラリアに次いで死者数の多い重要な原虫感染症である。熱帯・亜熱帯の開発途上国を中心に、世界の1%が感染し、年間約10万人が感染により死亡する。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。

赤痢アメーバ症は開発途上国に限らず、我が国を含む先進諸国においても、重要な社会問題となっている。特に、施設に居住する長期滞在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)、特にHIV陽性者において、高い潜在的感染率を示している。また、知的障害者ではアウトブレイクがしばしば報告され、精神衛生行政上の重大な問題であり、厚生行政上の具体的な危機となり得る。

全ゲノムの解読により赤痢アメーバの研究はポストゲノム時代に入り、オミクス研究手法が応用されるようになった。本研究ではこれらの手法を利用し、病原性・分化・寄生等の感染症において共有される重要な

生物学的命題に取り組むことを目指した。特に、病原機構や細胞分化に関わる遺伝子をオミクス手法により発見し、更に、それぞれの遺伝子機能を逆遺伝学的に証明することを具体的な目標とした。最終年度は、2年度までに同定された病原性や細胞分化に関与する遺伝子の機能を証明するのに不可欠である形質転換系の作製を行った。更に、2年度の嚢子化過程の経時的発現プロファイリングで同定された遺伝子に関して、その局在と機能解析を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 赤痢アメーバ関連種 *Entamoeba invadens* の培養並びに嚢子化誘導

赤痢アメーバと同様に腸管に感染し同様の病態を示す関連種 *Entamoeba invadens*, IP-1 株を用いた。培養は BI-S-33 培地を用いて 26 °C で行った。嚢子化は対数増殖期にある栄養型を、遠心濃縮後、47% LG 培地 (Sanchez et al., 1994) に移し誘導した。

##### 2. *Entamoeba invadens* の形質転換系の作製

外来性遺伝子の発現を評価するために、ホタル(firefly)とウミシイタケ(renilla)の緑色蛍光タンパク質(green fluorescence protein)をレポーターとした発現プラスミドを構築した。転写プロモーター、及び下

流ポリアデニレーション付加シグナル領域として、アクチン(Actin)、システイン合成酵素(Cysteine synthase, CS)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(Protein disulfide isomerase, PDI)を用いた。核酸導入法として、リポソームによる方法(リポフェクション)を用いた。リポフェクションは Lipofectamine を用いてほぼ常法に従って行った。

ルシフェラーゼアッセイは Dual-luciferase reporter assay 系(Promega)を用いた。

### 3. 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. *Entamoeba invadens* の形質転換系の確立

現在ヒトに病原性を示す赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)において、インビトロ、インビボで嚢子化を誘導する系は存在しない。一方、赤痢アメーバの関連種であり、ヘビにおいて同様の腸管病変を起こす *Entamoeba invadens* は嚢子化の唯一のモデルであるが、これまで形質転換は達成されていない。そこで本研究では、嚢子化の分子機構を解明するために、*E. invadens* の形質転換系を開発した。至適化の結果、 $10^5$  の栄養型に対して、5-10microgram の DNA が最適であることが示された (図 1)。

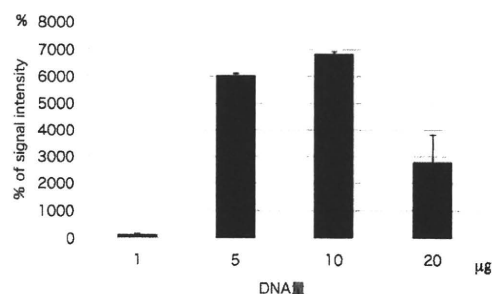


図 1 DNA 量の至適化

更に、リポソームとの処理時間は 24 時間が、ルシフェラーゼアッセイは 48 時間後、24,72 時間に比較して最適であった。転写活性は Actin, CS の順に高く、PDI では活性が検出されなかった。

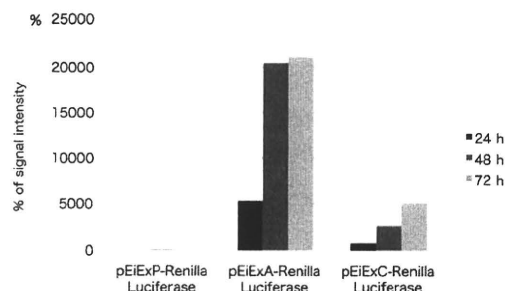


図 2 転写プロモーターの相違によるルシフェラーゼ活性の相違

pEiExP, A, C はそれぞれ PDI, Actin, CS をプロモーターに有する。24-72h はトランスフェクション後のアッセイの時点を示す。

### 3. 安定形質転換体の選択に用いる薬剤の感受性試験

次に今後安定形質転換体を作成するために不可欠な薬剤選択マーカーを選択するために、G418(Neomycin), Hygromycin, Puromycin の 3 剤の感受性を調べた。薬剤無しの増殖曲線(A)と終濃度 0, 1, 5, 10, 20, 30 mg/mL の G418 また Puromycin を加え、1 週間後に計測した細胞数を示す(B)。

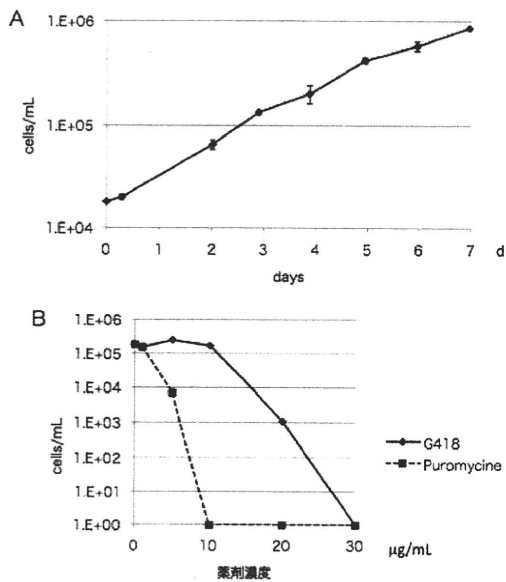


図3 A. *Entamoeba invadens* 栄養型の増殖 (B)G418, puromycin 存在下での増殖阻害

#### 4. 嚢子化初期段階の重要な転写因子の同定

図2に47%LG培地中での嚢子化の効率を示す。嚢子化はグルコース飢餓と浸透圧の低下により誘導される。形態的变化は24時間後から始まり、48時間後に約35-50%、72時間後に約50-70%、120時間後に80-95%がSarkosylに耐性を示す「形態学的」嚢子に達した。

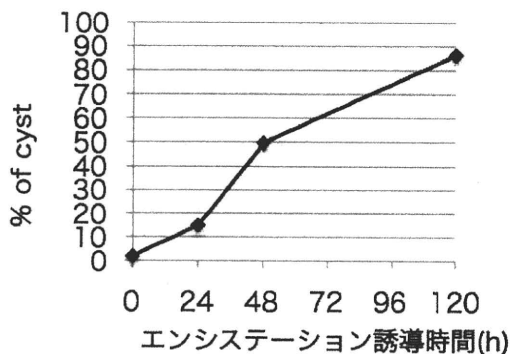


図4 47%LG培地内での嚢子化の効率を示す

嚢子化のマスター遺伝子を同定することを目的として、DNAマイクロアレイ解析から、転写因子を抽出した。

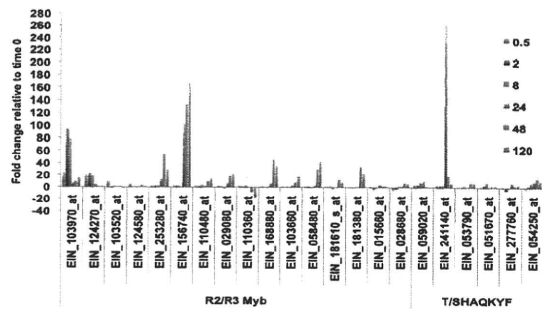


図5 嚢子化における Myb 転写因子遺伝子の発現プロファイル

*E. invadens* は16種のR2/R3 Mybと7種のT/SHAQKYF Mybを有するが、そのうち、EIN\_103970は2-8時間後に明瞭な一過性発現上昇を示した。また、EIN\_124270は、EIN\_103970に比べ発現ピークは低いものの、0.5-8時間後にのみ転写が見られた。一方、EIN\_241140は24時間のみ発現が見られた。また、EIN\_156740は24-120時間のみで発現が見られた。以上の結果から、これらのMyb転写因子が嚢子化のそれぞれの相で重要なマスター遺伝子として機能することが示唆された。

#### D. 考察

細胞分化の分子基盤を理解することは、新規な抗赤痢アメーバ薬剤を開発するために重要である。既存のメトロニダゾールは腸管吸収性に優れ、栄養型への殺滅作用は高いが、一方で嚢子への効果は低い。従って嚢子化を阻止した上で栄養型を殺す戦略が、伝搬を阻止するためには重要である。本研究により、我々は、赤痢アメーバの嚢子化の分子基盤を明らかにするための網羅的遺伝子プロファイリングを終了したとともに、各遺伝子の機能を解析する必要不可欠な技術基盤を確立した。*E. invadens*を用いた形質転換はこれまで達成されておらず、これにより嚢子化過程の各遺伝子の解明が急速に進展すると予想される。また安定形質転換体の作成に不可欠な転写プロモーターや薬剤選択マーカーも得られ今後の具体的な準備は十分に整ったといえることができる。

DNA マイクロアレイ解析により得られた嚢子化過程の各時点で発現制御されている遺伝子が明らかにされた。そのうち我々は3年次に特に、上流の Myb 転写因子に注目して解析を進めた。図5で示すように、23種の Myb 転写因子は時点特異的な発現パターンを示し、これらが嚢子化過程の細かな相において制御因子として機能している可能性を示唆している。E. invadens の形質転換系の確立と嚢子化特異的 Myb 転写因子の同定は、今後の嚢子化のマスター遺伝子の特定、嚢子化シグナル伝達経路の解明に重要な貢献をすると予想される。更に、今後の嚢子化を阻害する薬剤標的の同定への道を開いたといえることができる。

## E. 結論

3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。確立された E. invadens の形質転換系と同定された嚢子化特異的転写因子の発見は今後の嚢子化過程の分子論的理解に重要な貢献をすると期待される。

## F. 健康危険情報

該当せず

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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.
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., and Nozaki, T. (2010) Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Exp. Parasitol.* 126, 337-347. (Review)
- Mendoza-Macías, C. L., Barrios-Ceballos, M. P., Anaya-Velázquez, F., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., and Padilla-Vaca, F. (2010) *Entamoeba histolytica*: molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. *Exp. Parasitol.* 125, 279-285.
- Mishra, V., Ali, V., Nozaki, T., and Bhakuni, V. (2010) *Entamoeba histolytica* phosphoserine aminotransferase (EhPSAT): Insights into the structure-function relationship. *BMC Research Notes* 3, 52. doi:10.1186/1756-0500-3-52.
- 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.
- Saito-Nakano, Y., Nakahara, T., Nakano, K., Nozaki, T., and Numata, O. (2010) Marked amplification and diversification of Rab GTPases in ciliates *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* (in press).
- Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Metabolome analysis revealed increase in S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 285, 39160-39170.
- Mukherjee, A. K., Das, K., Bhattacharya, M. K., Nozaki, T. and Ganguly, S. Trend of *Entamoeba histolytica* infestation in Kolkata. *Gut Pathogens* 2010, 2:12doi:10.1186/1757-4749-2-12.
- 佐藤暖、野崎智義 (2010) 赤痢アメーバ原虫に対するトリフルオロメチオニン



誘導体の有効性 ビタミン 84,  
250-254.

## 2. 学会発表

- 古川敦、津久井久美子、山田陽子、坪井久美子、野崎智義 赤痢アメーバにおける病原性因子輸送機構の分子論的解明：新規システインプロテアーゼレセプターの同定と機能解析 第 79 回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20-21, 2010.
- 見市文香、牧内貴志、モハンマド・アブ・ユースフ、野崎智義 赤痢アメーバ原虫"mitosome"に存在する硫酸活性化経路の生理機能の解明 第 79 回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20-21, 2010.
- 牧内貴志、見市文香、津久井久美子、野崎智義 Entamoeba マイトソームにおけるタンパク質輸送機構の解析 第 79 回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20-21, 2010.
- 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
- 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
- Nozaki, T. Unprecedented role of the mitosome in Entamoeba histolytica. The 18th Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology, July 2-7, 2010, Kanazawa, Japan
- Nozaki, T. Mitosomes from the enteric protozoan parasite Entamoeba histolytica possess unique functions and minimal import machinery. The XIIth International Congress of Parasitology. August 15-20, 2010, Melbourne, Australia.
- Saito-Nakano, Y., Okada, M., Penuliar, G., M., Hanadate, Y., Gilchrist, C. A., Crasta, O., Petri, Jr., W. A., Fei, Z., Trapaidze, Ni., and Nozaki, T. Diversity and significance of vesicular trafficking in Entamoeba histolytica. Amebiasis Workshop 2010, "Molecular Approaches and Clinical Aspects" September 22-24, 2010, Montreal.
- Nozaki, T., Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Suematsu, M., and Soga, T. Metabolomic analysis of Entamoeba: discovery of unique pathways and potential targets for chemotherapy. Amebiasis Workshop 2010, "Molecular Approaches and Clinical Aspects" September 22-24, 2010, Montreal.
- Penuliar, G. and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in Entamoeba histolytica. Amebiasis Workshop 2010, "Molecular Approaches and Clinical Aspects" September 22-24, 2010, Montreal.
- Escueta-de Cadiz, A., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. Entamoeba invadens: Transcriptome analysis during encystation. 21st Molecular Parasitology Meeting, WoodsHole, Massachusetts, USA. September 12-16, 2010
- Nozaki, T., Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K. Functional diversity of mitochondrion-related organelles in eukaryotes. 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 神戸、December 7-10, 2010 (WS 進化からみたタンパク質

- 社会)
- Andrabi, S. B. A., 田原美智留、青沼宏佳、遠山知子、田邊和祐、野崎智義 トキソプラズマが産生する植物ホルモン、サイトカイニンの原虫増殖に与える影響 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 神戸、December 7-10, 2010 (WS 細胞内共生オルガネラが駆動する生物の進化と多様性)
- 村野祥子、佐藤暖、唐木剛、岡知宏、亀井加恵子、中沢隆、野崎智義、原田繁春 一連の酵素反応中間体との複合体構造に基づいた *Entamoeba histolytica* メチオニンガンマリアーゼ1の酵素反応機構第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 神戸、December 7-10, 2010
- Saito-Nakano, Y., Nakano, K., and Nozaki, T. Diversity of vesicular trafficking in phagocytic protozoa and significance of traffic in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Escueta-de Cadiz, A., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. *Entamoeba invadens*: transcriptome analysis during encystation. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Jeelani, G., Sato, D., Husein, A., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomic analysis during differentiation of enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* into the infectious cyst stage. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Andrabi, S. B. A., Tahara, M., Aonuma, H., Toyama, T., Tanabe, K., Nozaki, T., and Nagamune, K. Plant hormone cytokinins: elucidating their role in *Toxoplasma gondii*. Husain, A. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Trafficking mechanisms of phagosomal proteins in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Mi-ichi, F., Yousuf, A., Makiuchi, T., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Gene silencing of mitochondrial proteins causes growth inhibition and suggests essentiality of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Mi-ichi, F., Ali, V., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomic analysis of sulfur containing amino acid metabolism in *E. histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Analysis of the protein import machinery in the *Entamoeba* mitochondrial remnant. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Analysis of the protein import machinery in the *Entamoeba* mitochondrial remnant. Biology of Symbiosis: Memorial Symposium for the 26th International Prize for

Biology-Celebrating Dr. Nancy A.  
Moran. December 7-8, 2010, Tsukuba,  
Japan.

1. 特許取得  
該当せず
2. 実用新案登録  
該当せず

H. 知的所有権の出願・登録状況

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た。病原性 *Entamoeba histolytica* では IL-6、TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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。本年度はその炎症惹起能と病原性の関係に着目して研究を進めた。

病原性が未確定の *E. moshkovskii* は、病原性 *E. histolytica* と同様 CBA/J や C3H/HeN、C3H/HeJ マウスの腸管に定着できることが明らかとなった。上記マウスにおいて *E. histolytica* は中程度の炎症を惹起して慢性感染に移行した。一方、*E. moshkovskii* は下痢症状に加えて典型的なイチゴゼリー状の粘血便を引き起こすなど激しい炎症を惹起するに止まらず、感染 8-12 日目をピークに有意な体重減少を引き起こし、およそ 2 週間で腸管から排除された。一方、非病原性アメーバ *E. dispar* は上記マウスの腸管に定着できなかった。*E. moshkovskii* が病原性を有するというのは新知見であり、我々がバングラデシュで展開しているコホート研究からも *E. moshkovskii* がヒトにおいて下痢原性を有することが示唆されている。

上述のように、炎症惹起能と病原性の間に相関関係が見出されており、さらなる研究の進展によって感染防御機構の理解が深まると期待される。

## 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。

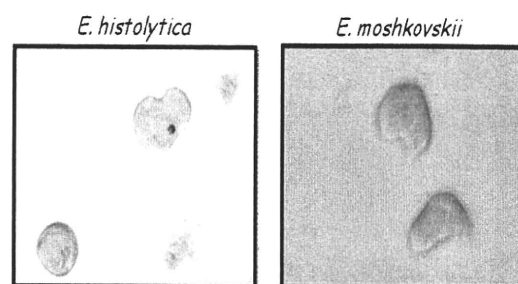
昨年度は、1) 病原性アメーバと非病原性アメーバの炎症性サイトカインの発現誘導能を比較検討した。病原性 *Entamoeba histolytica* では IL-6、TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインの産生が誘導されるのに対して、非病原性アメーバ *E. dispar* では誘導されなかった。一方、*E. moshkovskii* でも炎症性サイトカインの産生が誘導されたが、その産生パターンは、IL-6 の産生が極端に低く TNF- $\alpha$  優位のサイトカイン産生が認められるなど、*E. histolytica* 認識時とは異なった。*E. histolytica* ならびに *E. moshkovskii* で誘導される炎症性サイトカインは MyD88 依存性であることも判明した。

本年度は上記結果を踏まえて、各ヒト寄生性アメーバのマウス定着能と病原性ならびに感染の動態を解明した。

## B. 研究方法

5系統の近交系マウス(CBA/J, C3H/HeN,

C3H/HeJ, C57BL/6, BALB/c) の虫垂に以下の3種のヒト寄生性アメーバ(*E. histolytica*, *E. moshkovskii*, *E. dispar*) 栄養体を接種した。



各アメーバのマウス腸管への定着能を調べると共に、下痢原性、体重の変化、原虫の感染動態、ならびに赤痢アメーバ特異的な IgG, IgA の動態を測定・観察した。また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さらに進めた。

(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

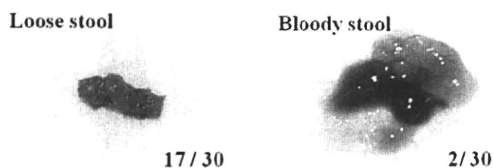
まず上述3種のアメーバの近交系マウス腸管への定着能を調べた。

	<i>E. histolytica</i>	<i>E. moshkovskii</i>	<i>E. dispar</i>
BALB/c	0/10 (0%)	0/10 (0%)	
C57BL/6	0/15 (0%)	1/18 (6%)	0/10 (0%)
C3H/HeJ	6/10 (60%)	4/10 (40%)	
C3H/HeN	5/10 (50%)	6/10 (60%)	
CBA/J	16/25 (64%)	21/35 (60%)	0/20 (0%)

The infection was examined on day 7 after challenge.

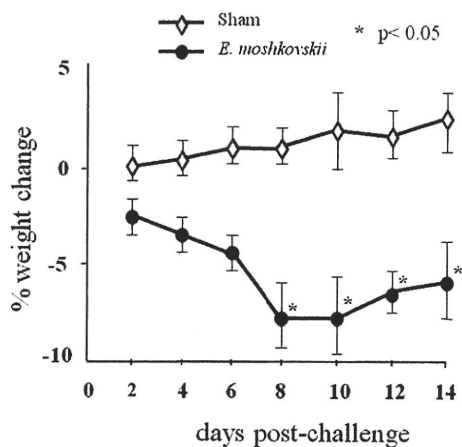
病原性が未確定の *E. moshkovskii* も、病原性 *E. histolytica* と同様 CBA/J や C3H

/HeN、C3H/HeJ マウスの腸管に定着できることが明らかとなった。また、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。



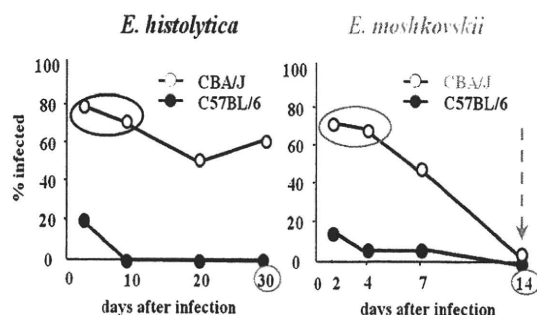
*E. moshkovskii* による下痢・粘血便

さらに、*E. moshkovskii* はCBA/J マウス腸管に一定期間定着・感染し、下痢症状に加えて典型的なイチゴゼリー状の粘血便を引き起こすなど激しい炎症を惹起した。



また、*E. moshkovskii* は感染 8-12 日目をピークとする有意な体重減少を引き起こした。

病原性 *E. histolytica* と *E. moshkovskii* のCBA/J や C57BL/6 近交系マウス腸管での感染動態は以下の通りであった。



*E. histolytica* は中程度の炎症を惹起して慢性感染に移行したものの、*E. moshkovskii* は激しい炎症を惹起し、感染およそ 2週間で腸管から排除された。赤痢アメーバに対する感染防御と赤痢アメーバ特異的な IgA の関連が報告されているので、*E. histolytica* 慢性感染系を用いて赤痢アメーバのレクチン Igl 特異的な IgA の糞便内検出を試みた。すると *E. histolytica* 慢性感染マウスでは Igl 特異的な IgA の産生が認められた。

#### D. 考察

*E. moshkovskii* は 1941年に同定されたアメーバであり、当初、自由生活性アメーバであると考えられていた。1961年に Texas の Laredo で下痢、体重減少を呈する患者から分離された株が *E. histolytica* Laredo 株と命名されたが、この株は *E. moshkovskii* と生物学的特徴を共有しており、後に *E. moshkovskii* と同一であることが判明した。上述のように *E. moshkovskii* はヒトに寄生可能なアメーバであり、下痢患者から分離されたエピソードのある病原体である。近年の分子生物学的手法の発達により、*E. moshkovskii* が発展途上国において高頻度に感染していることが判明してきているが、ヒトにおける病原性についてはようやく研究が端緒についたばかりである。

本年度の研究より *E. moshkovskii* が潜在的に病原性を有しており、少なくともマウスにおいては病原性 *E. histolytica* と同様の宿主域を示し、下痢と体重減少を主体とした臨床症状を引き起こすことが判明し、ヒトにおける下痢原性のさらなる研究が必要となってきた。

さらに、*E. histolytica* と *E. moshkovskii* がマウス腸管において全く異なる感染動態を示すことが明らかとなった。一旦感染が成立した後、*E. histolytica* は慢性持続性感染に移行するが、*E. moshkovskii* は感染14日目までに排除された。この現象は一義的には *Entamoeba* spp. の違いによるものであり、非病原性アメーバ *E. dispar* も加えた病原性因子の探索に道を拓くものである。一方、宿主サイドから見ると、CBA/J マウスにおける *E. histolytica* 感染はアメーバが持続感染する系を、*E. moshkovskii* 感染はアメーバが排除される典型的な系を提供するものであり、赤痢アメーバに対する感染防御機構を研究する上、非常に有用な研究基盤をなす知見である。

本研究では *E. histolytica* 慢性感染系を用いて赤痢アメーバのレクチンである Igl 特異的な IgA の糞便内検出を試みた。すると *E. histolytica* 慢性感染マウスでは Igl 特異的な IgA の産生が認められた。再感染防御に機能すると考えられる赤痢アメーバ特異的 IgA は、すでに腸管に定着している赤痢アメーバの排除には機能しない可能性が示唆された。詳細を明らかにするためには更なる研究が必要である。

昨年までの研究で、*E. histolytica* ならびに *E. moshkovskii* の表面に存在する PAMPs は共に免疫系に認識され、そのシグナルは MyD88 依存性に伝達されるものの、炎症性

サイトカインの産生パターンの違いから、両種の PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) の構成が異なることが示唆されている。一方、非病原性 *E. dispar* には炎症性サイトカインの産生誘導能がなく、これら PAMPs による免疫応答の誘導が、原虫の腸管内定着や病原性ならびに感染防御とどのような関係にあるのかを明らかにしていく必要がある。

## E. 結論

病原性が未確定の *E. moshkovskii* も、病原性 *E. histolytica* と同様 CBA/J や C3H/HeN、C3H/HeJ マウスの腸管に定着できることが明らかとなった。上記マウスにおいて *E. histolytica* は中程度の炎症を惹起して慢性感染に移行した。一方、*E. moshkovskii* は下痢症状に加えて典型的なイチゴゼリー状の粘血便を引き起こすなど激しい炎症を惹起するに止まらず、感染 8-12 日目をピークに有意な体重減少を引き起こし、およそ 2 週間で腸管から排除された。*E. moshkovskii* が病原性を有するというのは新知見である。一方、非病原性アメーバ *E. dispar* は上記マウスの腸管に定着できなかった。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Ishida, H., Matsuzaki-Moriya, C., Imai, T., Yanagisawa, K., Nojima, Y., Suzue, K., Hirai, M., Iwakura, Y., Yoshimura, A., Hamano, S., Shimokawa, C., Hisaeda, H.: Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17.

**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2010; 402: 790-795.

2. 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; 40: 833-843.
  3. Miyazaki, Y., Hamano, S., Wang, S., Shimano, Y., Iwakura, Y., Yoshida, H.: IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 2010; 185: 1150-1157.
  4. Imai, T., Shen, J., Chou, B., Duan, X., Tu, L., Tetsutani, K., Moriya, C., Ishida, H., Hamano, S., Shimokawa, C., Hisaeda, H., Himeno, K.: Involvement of CD8+ T cells in protective immunity against murine blood-stage infection with *Plasmodium yoelii* 17XL strain. **Eur. J. Immunol.** 2010; 40: 1053-1061.
- 教科書、一般書執筆
1. 濱野真二郎、吉田裕樹: 寄生虫感染と免疫応答、感染症 2010; 40: 205-211.
- 学会発表
1. 第80回日本寄生虫学会大会、東京、2011年3月、Chikako Shimokawa, Seiki Kobayashi, Masachika Senba, Eric Houpt, William A Petri Jr., Rashidul Haque, Shinjiro Hamano: Pathogenicity of *Entamoeba moshkovskii* in human and mice.
  2. 第80回日本寄生虫学会大会、東京、2011年3月、Kentaro Kato, Shinjiro Hamano: A comparative study on glycosylation patterns of mucus glycoprotein between CBA and C57BL/6 mice.
  3. 第4回 原虫感染免疫研究会、長崎、2011年2月、Chikako Shimokawa, Mamum Kabir, Mami Taniuchi, Dinesh Mondal, Seiki Kobayashi, Ibne Karim M. Ali, Masachika Senba, Eric Hoput, Haque Rashidul, William A. Petri Jr., Shinjiro Hamano: A study on the pathogenicity of *Entamoeba moshkovskii*.
  4. 富山大学和漢医薬学総合研究所および長崎大学熱帯医学研究所の合同会議「熱帯医学と和漢薬研究の新展開 -新しい医療体系の構築をめざして-」、長崎、2011年2月、濱野真二郎: 新しい病原性腸管アメーバ
  5. 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases, Tokyo, 2011年1月、Shinjiro Hamano: A study on the pathogenicity of *Entamoeba moshkovskii*.
  6. Intestinal and Free-Living Protozoan Parasites Meeting in 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases, Tokyo, 2011年1月、Shinjiro Hamano: A study on the pathogenicity of *Entamoeba moshkovskii*.
  7. 第63回 南日本支部会、鹿児島、2010年



11月、下川周子、小林正規、千馬正敬、加藤健太郎、大野民生、濱野真二郎、マウスモデルを用いた赤痢アメーバの病原性発現機構の解析

8. 第9回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、長崎、2010年10月、下川周子、小林正規、千馬正敬、加藤健太郎、大野民生、Haque Rashidul, William A. Petri Jr., 濱野真二郎: 赤痢アメーバの病原性に関する研究
9. 第14回国際免疫学会、神戸、2010年8月、Chikako Shimokawa, Seiki Kobayashi, Masachika Senba, Eric Houpt, Shinjiro Hamano: *Entamoeba moshkovskii* can establish the infection in the cecum of mice and induce pro-inflammatory cytokine production.
10. 第18回分子寄生虫学ワークショップ、草津、2010年8月、下川周子、小林正規、千馬正敬、加藤健太郎、大野民生、Haque Rashidul, William A. Petri Jr., 濱野真二郎: *E. moshkovskii* の病原性に関する研究
11. 第18回分子寄生虫学ワークショップ、草津、2010年8月、加藤健太郎、濱野真二郎: ムチン型糖鎖と寄生虫感染

#### 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

分担研究者 三田村俊秀 国立国際医療研究センター研究所 室長

研究要旨： マラリアの治療・予防戦略につなげることを念頭に、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を基に、熱帯熱マラリア原虫の生活環のモデルとして、ローデントマラリア原虫の一種 *Plasmodium berghei* のマウス感染系を用いて、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（Des9）遺伝子の破壊株の樹立とその表現型の解析を行った。マラリア原虫生活環全般に渡り解析した結果、Des9 の欠損が顕著に表れる時期は、マラリア原虫感染ハマダラ蚊の吸血により、マウスへの感染が成立する時期であると結論した。この結果を熱帯熱マラリア原虫に対応させて考えると、マラリア臨床症状・病理が発症する以前に相当し、本成果は、マラリア発症予防戦略構築に資するものであるといえる。

#### A. 研究目的

マラリア原虫は、ヒトとハマダラ蚊の間をシヤトルすることにより、その生活環を維持している。感染症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。同時に、赤血球ステージ以外の原虫増殖を抑えることは、原虫の生活環に破綻が生じ、原虫の消滅につながる。したがって、発症予防、伝搬阻止戦略となりえる。私達は、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、その分子基盤を明確化することにより、新たな治療・予防戦略につなげることを念頭に研究を継続している。

これまでの研究から、オレイン酸 ( $C_{18:1, n-9}$ ) は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の増殖に欠くことのできない血清中因子の一つであると推定した。また、ステアリン酸 ( $C_{18:0}$ ) からオレイン酸を産生する活性 ( $\Delta 9$ -desaturase (Des9) 活性) が、赤血球期原虫の増殖を良好に維持できる条件下において、恒常的に発現していることを明らかにした。これらの結果を基に、Des9 活性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、その活性の候補遺伝子と考えられる stearyl-CoA  $\Delta 9$ -desaturase 遺伝子の破壊株の作成とその表現型の解析を行ってきた。結果として、熱帯熱マラリア原虫ゲノム中に候補遺伝子としてアノテートされている遺伝子は、Des9 の本体であることが明らかとなり、

Des9 遺伝子の破壊は、赤血球期熱帯熱マラリア原虫の初期の増殖にはほとんど影響を与えないが、細胞周期進行に何らかの影響を及ぼすことが明らかとなった。

本分担課題においては、熱帯熱マラリア原虫の生活環全体における Des9 の役割を解析するために、モデルとしてのローデントマラリア原虫の一種 *Plasmodium berghei* のマウス感染系を利用し、*P. berghei* Des9 遺伝子破壊株の作成とその表現型の解析を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. *P. berghei* Des9 遺伝子破壊株の作成

マラリアゲノム情報のデータベース PlasmoDB

(<http://www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp>) 上において、熱帯熱マラリア原虫 Des9 の本体をコードしていることを明らかにした遺伝子座 (PFE0555w) と高いシンテニーを示す *P. berghei* PBANKA\_111070 遺伝子座の 5'UTR と PbDes9 の中央領域をコードする断片を *P. berghei* ANKA 株の gDNA より、それぞれ PCR により増幅、塩基配列の確認後、ベクターに組み込みノックアウトコンストラクトとした。作成したプラスミドを赤内型原虫に導入後、薬剤選択によりコンストラクトが挿入されたと予想される原虫を濃縮した。ゲノム PCR によりコンストラクトのゲノムへの挿入を確認後、限外希釈法によるクローニン化を行い、ノックアウトクローン株 (PbDes9 KO) を取得した。

## 2. PbDes9 KO の表現型の解析

感染マウス内での赤内型の増殖、感染マウスを吸血させた感染ハマダラ蚊内でのオーシストの形成能、感染ハマダラ蚊から調製したスポロゾイトのマウスへの感染能について、親株と PbDes9 KO で比較した。

(倫理面への配慮)

全ての実験は、該当機関における組み換え DNA 規定、病原体取扱規定に準拠し、認可を受けておこなった。

## C. D. 研究結果および考察

マラリア原虫感染マウス内における赤内型の初期の増殖においては、PbDes9 KO と親株はほぼ同程度であったが、その後 PbDes9 KO の増殖に明らかな遅延が観察された。しかし、最終的に到達する感染率のレベルに大差はなかった。

感染マウスをハマダラ蚊に吸血させた後の感染蚊体内に形成されるオーシストの数は、PbDes9 KO と親株との間で有意な差がなかった。また、PbDes9 KO、親株感染蚊唾液腺内には、マウスへの感染形態であるスポロゾイトが同程度数形成された。

感染ハマダラ蚊唾液腺内に形成されたスポロゾイトを調製し、一定数をマウス尾静脈に注射後赤内型の出現を観察したところ、親株に比べて、PbDes9 KO では赤内型が観察されるマウスの頭数は著しく少なかった。

以上、マラリア原虫の生活環全般に渡る親株と PbDes9 KO それぞれの増殖についての表現型の解析を通じて、Des9 の重要性が顕著に表れるステージは、感染ハマダラ蚊の吸血によるマウスへの感染が成立する時期であることがわかった。さらなる詳細についての解析が必要ではあるが、熱帯熱マラリア原虫の生活環のモデルとして用いたローデントマラリア原虫のマウス感染系の解析から得られた本成果は、ヒトマラリア感染において、Des9 を阻害することにより、赤内型への移行が阻害できる発症予防の対策につながるものであると考えられる。

## E. 結論

熱帯熱マラリア原虫の生活環のモデルを用いた解析により、Des9 の重要性が顕著に表れるステージを限局することに成功した。本成果は、マラリア発症予防戦略開発につながりうるものであるといえる。

## 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) 三田村俊秀、岡田麻美、見市文香、栃倉英人、野崎智義、狩野繁之：熱帯熱マラリア原虫  $\Delta 9$ -desaturase の赤血球期における役割：第 79 回日本寄生虫学会大会、旭川市大雪クリスタルホール、2010. 5. 20-21.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金  
(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 室長

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、宿主側 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、GPI アンカー生合成能欠失変異 CHO 細胞の原虫への感受性を野生株と比較した。その結果、変異株は野生株に対し有意に感受性が上昇していた。また野生株と変異株では感染後期の増殖に差が認められた。これらのことから、宿主の GPI アンカー又は 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。原虫の増殖に影響を与える要因として、ロプトリー蛋白質に着目した。ロプトリー蛋白質は、parasitophorous vacuole 膜 (PV 膜) の形成に関与することが知られており、原虫の宿主侵入の際に小胞 (evacuole) として原虫から宿主に注入される。原虫による ROP1、2 及び 16 の evacuole 形成能を両細胞間で比較したところ、変異株で明らかに evacuole の形成が過剰になっていた。また、ROP1、2 及び 16 の過剰な evacuole の一部は、共局在していた。増殖の際、PV 膜に宿主のミトコンドリアや ER がリクルートされ、特にミトコンドリアのリクルートには ROP2 が関与することが知られている。そこで原虫のミトコンドリア・リクルート能を両細胞間で比較したところ、明らかに変異株内でのリクルートが増加していた。これらのことから、GPI 生合成能欠失株では、原虫による evacuole 形成が過剰になり、PV 膜へのミトコンドリア・リクルート能が増加した結果、増殖が増大した可能性が示唆された。

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 Gaa1(-)) 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、および evacuole 形成能を詳細に検討した。  
(倫理面への配慮)