

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。

次に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 が関与することが報告されている。そこで原虫のミトコンドリア・リクルート能を、宿主細胞ミトコンドリアを MitoTracker あるいは COX IV 抗体による染色で比較したところ、明らかに変異株内でのリクルートが増加していた。

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ロプトリータンパク質の宿主細胞への注入に着目して解析した。その結果、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。一方で変異株内ではリクルートされたミトコンドリアが増加していた。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こし、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 の過形成を起こし、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) 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 2010, 4489: 39-43

(2) 永宗喜三郎 “トキソプラズマが産生する植物ホルモン。” 感染症・炎症・免疫 2010, 40: 181-183

2. 学会発表

(1) 招待講演

永宗喜三郎 “The role of plant hormone cytokinins on Toxoplasma

gondii.” 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 2010 2010年5月、長野県上田市

(2) Andrabi, S.B.A., Tahara, M., Aonuma, H., Toyama, T., Tanabe, K., Nozaki, T., Nagamune, K. “The effect of plant hormone cytokinins on *Toxoplasma gondii*.” 第79回日本寄生虫学会 2010年5月、旭川

(3) 青沼宏佳、遠山知子、田原美智留、Andrabi, S.B.A.、田邊和祐、永宗喜三郎 “植物ホルモンジベレリン生合成阻害剤はトキソプラズマの増殖を抑制する” 第79回日本寄生虫学会 2010年5月、旭川

(4) 遠山知子、永宗喜三郎、川出洋、堀井俊宏、田邊和祐 “Inhibitors of gibberellin, a plant hormone, induces swelling and rupture of intraerythrocytic

Plasmodium falciparum.” 第79回日本寄生虫学会 2010年5月、旭川

(5) 田原美智留、Andrabi, S.B.A.、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主細胞側 GPI アンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第79回日本寄生虫学会 2010年5月、旭川

(6) Andrabi, S.B.A., Tahara, M., Aonuma, H., Toyama, T., Tanabe, K., Nozaki, T., Nagamune, K. “The effect of plant hormone cytokinins on *Toxoplasma gondii*.” The 18th Meeting of the International Society for Evolutionary Parasitology, Kanazawa, Japan, July 2010

(7) Syed Bilal Ahmad Andrabi、田原美智留、青沼宏佳、遠山知子、田邊和祐、

野崎智義、永宗喜三郎 “トキソプラズマは植物ホルモン・サイトカイニンを産生し、原虫の増殖調節に用いている” 第18回分子寄生虫学ワークショップ 2010年8月、群馬

(8) Andrabi, S.B.A., Tahara, M., Aonuma, H., Toyama, T., Tanabe, K., Nozaki, T., Nagamune, K. “Plant hormone cytokinins: Elucidating their role in *Toxoplasma gondii*.” Molecular Parasitology Meeting XXI, Woods Hole, MA, USA, September 2010

(9) Syed Bilal Ahmad Andrabi、田原美智留、青沼宏佳、遠山知子、田邊和祐、野崎智義、永宗喜三郎 “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おける影響” 第9回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 2010年10月、長崎

(10) 招待講演
Nagamune, K. “Protozoan parasites and plant hormones.” International Symposium on Cell functions Mediated by Small Molecules, November 2010, Tsukuba

(11) Fkshi, M., Aonuma, H., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., Nagamune, K. “Analyzing the mechanism of action of primaquine on *Toxoplasma gondii*.” International Symposium on Cell functions Mediated by Small Molecules, Tsukuba, November 2010

(12) ワークショップ
Syed Bilal Ahmad Andrabi、田原美智留、青沼宏佳、遠山知子、田邊和祐、野崎智義、永宗喜三郎 “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
日本生化学会大会合同大会 2010 年
12 月、神戸

(13) Tahara, M., Andrabi, S.B.A.,
Aonuma, H., Kinoshita, T., and
Nagamune, K. "The effect of host
GPI-anchor to
Toxoplasma gondii infection." 45th
Annual Japan-U.S. Joint Conference
on
Parasitic Diseases, Tokyo, January,
2011

(14) Andrabi, S.B.A., Tahara, M.,
Aonuma, H., Toyama, T., Tanabe, K.,
Nozaki, T., Nagamune, K. "Plant
hormone
cytokinins: Elucidating their role in
Toxoplasma gondii." 45th Annual
Japan-U.S. Joint Conference on
Parasitic Diseases, Tokyo, January,
2011

(15) 招待講演
永宗喜三郎 “トキソプラズマの生存
戦略と進化” 帯広畜産大学 基礎獣
医学研究部門セミナー 2011 年 1 月、
帯広

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

赤痢アメーバのメタロニダゾール耐性に係る研究

研究分担者 津久井久美子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

赤痢アメーバによって引き起こされるアメーバ症は下痢を主症状とし、発展途上国を中心に年間 100 万人の感染が報告されている。アメーバ症の第一選択薬であるメタロニダゾールは発展途上国においても安価で処方しやすい薬であるため、その濫用から耐性株の出現が危惧される。近年国内でもアメーバ症の報告が増加しており 2007 年には 800 例に上った。さらに通常のメタロニダゾール処方 (2250mg/day, 10 日) で改善しにくい症例が散見されていることからメタロニダゾール耐性に対する危機感がある。そこで本研究では実験室で作出したメタロニダゾール耐性赤痢アメーバのトランスクリプトーム解析を行い、耐性機構の解明を行った。統計解析を行い 3 倍以上発現差のあった遺伝子を抽出したところ 82 遺伝子が該当した。その中で、最近メタロニダゾールの活性化を行うことが報告された EhN02 の発現が減少していた。よって他の原虫ではメタロニダゾールは Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase (PFOR) により活性化されるが、赤痢アメーバでは EhN02 が重要であることが示された。また、より高濃度のメタロニダゾールに耐性のある株の樹立も行い、本研究により見出された遺伝子の重要性と再現性を確認できる見通しとなった。今後本研究からの知見をもとに耐性株出現の予防方法、耐性株に対する新規薬剤の提案を目指したい。

A 研究目的

アメーバ症は発展途上国で下痢の主要原因の一つである。このため下痢の患者に原因不明のまま赤痢アメーバ薬メタロニダゾールが処方されることがある。この濫用は常に薬剤耐性アメーバ出現のリスクと隣り合わせである。また、近年増加している国内の赤痢アメーバ症患者においてフラジール 9 錠 (メタロニダゾール 2250mg) 10 日とい

うプロトコールで改善が悪い症例が散見されている。これは薬剤耐性アメーバの出現への危険信号と考えられる。そこで実験室で作成したメタロニダゾール耐性赤痢アメーバ株のトランスクリプトーム解析を行い、赤痢アメーバのメタロニダゾール耐性の分子機構を明らかにすることを目的とした。

B 研究方法

1. トランスクリプトーム解析

赤痢アメーバ株 (HM1:c16) を $0.5\mu\text{M}$ メタロニダゾール存在下培養し、徐々に薬剤濃度を上げることで、メタロニダゾール耐性株を得た。IC₅₀= $1.4\mu\text{M}$ のところ、 $8\mu\text{M}$ のメタロニダゾールに耐性の株を得た。続いて親株、薬剤存在下で培養した耐性株 (耐性株+)、7日間薬剤非存在下で培養した耐性株 (耐性株-)、の3種類のサンプルについてトリプリケートでトランスクリプトーム解析を行った。

2. 高濃度のメタロニダゾール耐性株の樹立

$1\mu\text{M}$ メタロニダゾール存在下培養し細胞が密集したら細胞を半分に分け、再び同じ濃度のメタロニダゾール存在下で培養した。次に細胞が密集してきたら 0.5 または $1\mu\text{M}$ 濃度を上げたメタロニダゾールを含む培地に交換し、再び細胞が密集状態になるまで培養し、半分に分けて同じ濃度のメタロニダゾール存在下で培養する、という手順を繰り返した。

C 研究結果

1. トランスクリプトーム解析

全てのチップで発現のない遺伝子を除き、one way ANOVA, post hoc test で有意に変動があるとされた遺伝子が親株 vs 耐性株+で 1802、親株 vs 耐性株-で 2630、耐性株+ vs 耐性株-で 2339 存在した。親株と耐性株+間の比較に着目し、3倍以上変動があった遺伝子を抽出した。これらの遺伝子について配列の重複、他種生物の遺伝子の混入と考えられるものを除き、BLASTサーチをかけてアノテーションの確認を行ったところ発現が上昇した遺伝子が 51、下降した遺伝子が 31 あった。発現が上昇した遺伝子には五つの代謝に関する遺伝子

(chitinase, dUTP nucleotidehydrolase, cysteine protease)・二つの低分子量 GTPase (Rho, Ras)・二つの DNA に結合する遺伝子 (poly(ADP-ribose) polymerase domain containing protein, reverse transcriptase)・八つの AIG1 family protein・Tyrosine kinase・repeat organellar protein、さらにアノテーション不明の遺伝子が 32 含まれていた。一方発現が下降した遺伝子には八つの代謝に関する遺伝子 (Glutamate synthase beta subunit, cysteine protease, phosphatase, sphingomyelinase-like, protein kinase, CDP-alcohol phosphatidyltransferase, long-chain-fatty acid-CoA ligase)・五つのシグナル伝達、小胞輸送に関する遺伝子 (ADP-ribosylation factor, type II/IV secretion system protein domain containing protein, Rab, Rap/Ran, Vps9 domain containing protein)・三つの AIG1 family protein・rhodanese homology domain containing protein・MAEBL domain containing protein・GRIP domain containing protein・WD domain containing protein・leucine rich repeat protein、さらにアノテーション不明の遺伝子が 10 含まれていた。

2. 高濃度のメタロニダゾール耐性株の樹立

研究方法に記した手順で培養し、 $12\mu\text{M}$ のメタロニダゾールに耐性の株を樹立することができた。

D 考察

1. トランスクリプトーム解析

最も大きな変動があった遺伝子は EHI_092110 (hypothetical protein) であ

り、83.5 倍発現上昇がみられた。これは 56 アミノ酸からなるペプチドであり、既知のドメインは特定できず機能不明であった。興味深いことに 8.3 倍の発現上昇が見られた chitinase (EHI_902100) と転写方向が逆ではあるが隣り合ってゲノムに存在する遺伝子であった。Chitinase は酵母で抗真菌剤耐性に関与すると報告されており (Bahmed et al., 2003)、キチンでできた細胞壁の再構成に関与すると考えられる。赤痢アメーバの栄養体は細胞壁を持たず、シスト化した場合にキチン質の細胞壁で覆われる。よって栄養体で chitinase 発現が亢進することとメタロニダゾールの耐性に直接の関係は見いだせなかった。細胞にストレスがかかるとシスト化へのトリガーが引かれ chitinase 発現につながるのかもしれないと考えられた。

発現上昇が見られた遺伝子である dUTP nucleotidohydrolyase (363.m00051, EHI_062990, EHI_034810) は DNA 修復を行うことが知られている。メタロニダゾールはグアニンに結合し DNA ダメージを起こすと報告されていることから (Ludlum et al., 1988)、ダメージの回避の分子機構が働いていると考えられた。

最も発現が下降した遺伝子は EHI_127670 であり 15 倍発現が減少していた。これは 111 アミノ酸をコードする遺伝子であるが、アノテーションされていない機能不明の遺伝子であった。次に発現減少が大きかった遺伝子は Glutamate synthase beta subunit (EHI_045340) であり、NADPH dependent oxydoreductase (EhN02) と報告された遺伝子である (Jeelani et al., 2010)。この酵

素はメタロニダゾールを活性化することが示されていることから、発現抑制によりメタロニダゾールの活性化を抑制したと考えられる。メタロニダゾール耐性が報告されている腫トリコモナス原虫や腸鞭毛虫ではメタロニダゾールの活性化を行う Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase (PFOR) の発現低下や活性低下が報告されている。昨年度の報告にあるように赤痢アメーバでは PFOR の発現変化は見いだせなかった。よって、赤痢アメーバでは何らかの理由で PFOR ではなく EhN02 がメタロニダゾールの活性化を中心的に行っていることが示唆された。

2. 高濃度のメタロニダゾール耐性株の樹立

新たに 1.5 倍の濃度のメタロニダゾール耐性株を得ることができた。新たな培養方法で、なるべく細胞数を減らさない状態で維持したために耐性株が得られやすかったと考えられる。今後、この細胞のトランスクリプトーム解析を行い、変動する遺伝子の再現性を確認する。

E 結論

赤痢アメーバメタロニダゾール耐性株では酸化還元状態を制御する遺伝子の発現変化に加え、DNA ダメージの回避、細胞壁再構成に関与する分子機構の活性化が起きていることが示唆された。また赤痢アメーバに於いてメタロニダゾールの活性化が PFOR ではなく主に EhN02 により行われていることが示された。今後、さらに分子機構活性化の再現性を検討した後、重要な分子機構の解析を進めていく。今回発見された機構は他の原虫では未発見の事実であり、赤痢アメーバに独自の耐性機構が存在することが示された。

G 研究発表

1 論文発表

Chung Chau Hon, Kumiko Nakada-Tsukui,
Tomoyoshi Nozaki and Nancy Guillen
(2010) Dissecting the Actin Cytoskeleton
of *Entamoeba histolytica* from a Genomic
Perspective. In " *Anaerobic Parasitic
Protozoa: Genomics and Molecular
Biology*" Edited by C. Graham Clark,
Patricia J. Johnson and Rodney D. Adam.
Caister Academic Press, ISBN:
978-1-904455-61-5, March 2010.

Kumiko Nakada-Tsukui and Tomoyoshi
Nozaki (2010) Genomic and post-genomic
approaches to understand the
pathogenesis of the enteric protozoan
parasite *Entamoeba histolytica*. In
" *Genomes of Food- and Water-borne
Pathogens*" Edited by Pina Fratamico,
Sophia Kathariou, and Yanhong Liu. ASM
Press, Washington, D.C. 2010, in press.

Nakada-Tsukui K, Saito-Nakano Y, Husain
A, Nozaki T. Conservation and function
of Rab small GTPases in *Entamoeba*:
Annotation of *E. invadens* Rab and its use
for the understanding of *Entamoeba*
biology. *Experimental Parasitology*
(2010) 126(3):337-47.

2 学会発表

該当なし

H 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

蠕虫遺伝子発現制御機構の解明及び寄生虫症診断法の開発

分担研究者 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発現遺伝子の分析は有効であり、そのためには蠕虫ゲノムとトランスクリプトーム解析の両者が必要になる。今年度はモデル寄生虫のひとつであるベネズエラ糞線虫のトランスクリプトームを新型シーケンサで解析し、約 14,000 の isotig/contig にアSEMBLし、7,560 に何らかのアンノテーションを付けることができ、1,591 については酵素活性を推定することができた。C. elegans タンパク質にヒットしたものは 10,569 個、統合線虫 EST データベースである NEMABASE4 には 11,367 個がヒットした。幼虫移行症の組換え診断システム構築のために、ブタ回虫およびイヌ回虫の組換えタンパク質を用いて患者血清との反応を調べたところ、病原体診断に使用できると考えられる結果を得た。

A. 研究目的

われわれは、multiple-dot ELISA 法による抗体スクリーニングと 96-well microtiterplate ELISA 法による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きた。2000 年以降、総検体数は年間 500 前後で推移し、毎年 100-200 例を寄生虫症と診断している。2010 年も 115 症例について寄生虫（蠕虫）感染症であると診断した（表 1）。

parasites	2006	2007	2008	2009	2010
イヌ回虫・ブタ回虫	82	101	78	49	48
アニサキス	4	6	3	2	2
イヌ糸状虫	5	1	1	0	0
顎口虫	0	6	7	9	3
鉤虫	0	1	0	1	1
マンソン孤虫	3	6	4	5	2
囊虫	0	0	0	1	0
肺吸虫	37	46	38	38	45
肝蛭	2	3	1	1	3
住血吸虫	6	6	4	4	3
肝吸虫	0	0	0	0	1
糞線虫	1	1	2	0	2
回虫	1	1	2	0	1
日本海・広節裂頭条虫	2	0	1	0	4

表 1 宮崎大学医学部寄生虫学教室における血清診断結果

表 1 に示す通り、例年診断症例数が多いのがイヌ回虫やブタ回虫などの動物由来の回虫類による幼虫移行症である。本症では主な標的臓器は肝および肺だが、幼虫は眼内や中枢神経に移行することがあり、蠕虫性疾患の中でも対処がやっかいな寄生虫である。しかも標準的な治療薬はアルベンダゾールのみとあってよく、肝機能障害等で治療の続行ができない場合の代替薬剤はきわめて限られている。

したがって、動物由来の回虫類の幼虫が、感染後にどのように宿主環境に適応し、人体内で移行経路を決定しているのか、また長期にわたって幼虫のまま生存できるメカニズムはどうなっているのかを解明することは、寄生虫学の長年の疑問を解くことになることはもちろん、新たな治療薬の開発にもつながりうる。

そこで本研究計画では、モデル寄生虫のベネズエラ糞線虫を用いて体内移行時の遺伝子発現を大規模に解析し、腸管寄生線虫の幼虫がどのように宿主環境に適応しているのかを解析した。

さらに、現在実施している寄生虫の血清診断法における問題点（抗原の入手が困難であることと粗抗原では擬陽性と真の陽性の判別が必ずしも容易でないこと）を解決するために、動物由来の回虫類による幼虫移行症および糞線虫症について組換え抗原を作製し、患者血清を用いて血清診断における有効性を検討した。

B. 研究方法

1. ベネズエラ糞線虫のトランスクリプトーム解析

ベネズエラ糞線虫の虫卵、感染幼虫、体内移行期幼虫（肺から回収）および成虫から cDNA を調製し、GS-FLX Titanium によって塩基配列を決定した。次いで Newbler v. 2.3 を用いてアセンブルし、ラット由来と考えられる配列および rRNA 配列を除いた。

次に得られた isotig データセットを用いて大規模相同性検索を他種線虫 (*Caenorhabditis elegans*, *Brugia malayi*) とハエ *Drosophila melanogaster* のタンパク質、そして線虫 EST の統合データベース NEMABASE4 に対して実施した。塩基配列から予測される遺伝子機能については、Blast2GO プログラムによって NCBI タンパクデータベースの BlastX 検索により、GO タームを決定した。

発育ステージにおける発現量の違いは、isotig をリファレンス配列としてリードデータを検索し (CLC genomics workbench)、各 isotig にマップされるリード数 (いわゆる「厚み depth」) によって推測した。

さらに、感染幼虫において特異的な発現がみられる *C. elegans* の NAS-34 に類似した astacin-like zinc-metalloprotease については、後述の通りきわめて多種類の類似した配列がトランスクリプトーム中に見出されたため、同遺伝子特異的なプライマーを用いてベネズエラ糞線虫のゲノム DNA をテンプレートに PCR をおこない、増幅産物をクローニングしてサンガー法によってクローンの塩基配列を決定した。

2. 組換え寄生虫抗原の血清診断への応用

幼虫移行症ではブタ回虫について組換え抗原を作製した。沖縄県および宮崎県内で採取されたブタ回虫のメスから虫卵を分離して幼虫包蔵卵を形成させウサギに投与し、感染 5-6 日後にウサギ肺から幼虫を回収した。この幼虫から cDNA ライブラリを作製し、得られたクローンの塩基配列を決定して、成虫や虫卵では発現の報告がないものを診断用抗原の候補とし、組換えタンパク質を作製した。

予備的な実験により As16 がもっとも有望であったので、以下の実験には As16 をもちいた。イヌ回虫の組換え抗原は、国立感染症研究所寄生動物部の山崎浩博士から TES32 の供与を受け実

験に使用した。また、糞線虫に関しては抗体検査に有用であるとの報告がある L3Nic 抗原をベネズエラ糞線虫の感染幼虫ライブラリからクローニングして組換えタンパク質を大腸菌で作製し、患者血清との反応を酵素抗体法で検討した。

以上の研究課題は、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。患者血清の使用も、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。

C. 研究結果

1. ベネズエラ糞線虫ゲノム解析

トランスクリプトーム解析の基本であるベネズエラ糞線虫のゲノムに関しては、昨年度のデータに SOLEXA のデータを加えた。その結果、ベネズエラ糞線虫のゲノムサイズは 50-100Mb 程度と推定された。ペアエンドライブラリの作製と解析、フォスミドライブラリの構築が進行中であるが、今年度用いた contig のデータは昨年度までに得られたものである。

2. ベネズエラ糞線虫トランスクリプトーム解析

虫卵、感染幼虫、肺移行期幼虫、および寄生世代メス成虫から cDNA ライブラリをそれぞれ作製し、GS-FLX で塩基配列を決定した。2 回のランにより総計 2,483,165 のリードが得られた。平均リード長は 389bp であった。リード数の内訳は、虫卵/L1 が 543,713、感染幼虫が 622,248、肺移行期幼虫が 679,257、成虫が 638,728 リードであった。

これらを Newbler v.2.3 によりアセンブルし、計 14,461 の isotig (トランスクリプトと考えられるもの) を得た。この中からバクテリアや宿主由来と考えられる配列、さらに 100 塩基に満たない短配列 isotig を除いた、残り 13,981 個の isotig (平均長 1,783 塩基、最長 20,744 塩基) を以下の解析に用いた。

13,981 個の isotig を *C. elegans*、*B. malayi*、*D. melanogaster* のタンパク質、ないし線虫 EST の統合データベース NEMABASE4 に対して相同性検索を実施したところ、*C. elegans* タンパク質にヒットしたものは 10,569 個、*Brugia malayi* は 9,779 個、線虫 EST の統合データベースである NEMABASE4 には 11,367 個がヒットした。つま

り、約 3,000 個の isotig はベネズエラ糞線虫特異的と考えられた。7,560 個に何らかのアノテーションを付けることができ、1,591 個については酵素活性を推定することができた。

リードの厚みによる半定量的な発現量解析により、発育段階特異的に発現がみられる isotig を虫卵で 20 個、感染幼虫で 43 個、肺移行期幼虫で 21 個、成虫で 134 個同定することができた。これらの中で感染幼虫では 10 個、肺移行期幼虫では 9 個のトランスクリプトがそれぞれアスタシン様メタロプロテアーゼと相同であり、ベネズエラ糞線虫におけるアスタシン様メタロプロテアーゼの重要性が浮き彫りになった。

ベネズエラ糞線虫の isotig と *C. elegans* タンパク質を比較した際に、単一の *C. elegans* タンパク質に多数のベネズエラ糞線虫 isotig がヒットする事例が多数みとめられたが、単一の *C. elegans* タンパク質である NAS (Nematode AStacin-like protease) -34 と相同なアスタシン様メタロプロテアーゼでは 117 種類の isotig がヒットした (表 2)。

contig/isotig ID	<i>C. elegans</i>	tentative annotation	occurrence
Contig02305...	F40E10.1	zinc-dependent metalloprotease, NAS-34 like	117
Isotig00079...	F37C12.1	-	79
Isotig00692...	T04D1.4	-	64
Isotig03977...	Y44E3A.2	acetylcholinesterase	45
Isotig00155...	Y69H2.3e	similar to scavenger receptor cysteine-rich protein	45
Isotig00765...	ZK1098.1	WW domain containing protein	36
Isotig00570...	ZC434.7b	-	32
Isotig00502...	C39D10.7	Chitin binding Peritrophin-A domain containing protein	30
Isotig08694...	T16H12.5b	similar to roadkill, isoform A	30
Isotig11169...	C04F6.5	Dehydrogenase	25

表 2 単一の *C. elegans* タンパク質にヒットしたベネズエラ糞線虫の isotig

NAS-34 は線虫のアスタシン様メタロプロテアーゼのひとつで、*C. elegans* にはゲノム中に NAS-1 から NAS-39 まで 39 個の NAS が存在する。そこで、他の NAS に相同性のある isotig についても調べたところ、ベネズエラ糞線虫のトランスクリプトには総計 161 種類、ゲノムには総計 211 種類の NAS 相同配列が存在した。ほとんどの NAS については *C. elegans* と近い個数の遺伝子しかなかったが、NAS-34 に限って相同プロテアーゼ遺伝子数が極端に多いことがわかった (表 3)。

<i>C. elegans</i> ID	Classification	<i>S. venezuelensis</i>	
		transcriptome	genome
F45G2.1	NAS-1	2	2
F56A4.1	NAS-2	0	0
K06A4.1	NAS-3	0	0
C05D11.6	NAS-4	1	2
T23H4.3	NAS-5	1	2
4R79.1	NAS-6	0	1
C07D10.4	NAS-7	1	1
C34D4.9	NAS-8	1	1
C37H5.9	NAS-9	0	1
K09C8.3	NAS-10	3	4
K11G12.1	NAS-11	0	0
C24F3.3	NAS-12	1	1
F39D8.4	NAS-13	1	2
F09E8.6	NAS-14	0	2
T04G9.2	NAS-15	0	1
K03B8.1	NAS-16	0	0
K03B8.2	NAS-17	0	1
K03B8.3	NAS-18	0	0
K03B8.5	NAS-19	0	0
T11F9.3	NAS-20	0	0
T11F9.5	NAS-21	0	0
T11F9.6	NAS-22	0	0
R10H1.5	NAS-23	5	5
F20G2.4	NAS-24	0	0
F46C5.3	NAS-25	0	2
T24A11.3	NAS-26	1	2
T23F4.4	NAS-27	1	4
F42A10.8	NAS-28	1	1
F58A6.4	NAS-29	0	1
Y95B8A.1	NAS-30	5	4
F58B4.1	NAS-31	1	6
T02B11.7	NAS-32	0	1
K04E7.3	NAS-33	5	4
F40E10.1	NAS-34	117	132
R151.5	NAS-35	12	7
C26C6.3	NAS-36	1	5
C17G1.6	NAS-37	1	13
F57C12.1	NAS-38	0	0
F38E9.2	NAS-39	0	3
Total		161	211

表 3 単一の *C. elegans* タンパク質にヒットしたベネズエラ糞線虫のトランスクリプトおよびゲノムの isotig/contig

次に NAS-34 に相同なアスタシン様メタロプロテアーゼのうちの一つの配列を標的に、ベネズエラ糞線虫ゲノムの PCR をおこない、増幅産物をサンガー法により塩基配列を決定した。

その結果、約 140 クローンから 87 種類のアスタシン様メタロプロテアーゼが得られた。つまり、表 3 のごく一部の配列と相同性の高いプロテアーゼ遺伝子がさらに 100 個近く存在している可能性が示された。これらはすべて活性中心やモチーフ、システインの位置が共通であり、すべてが機能的なプロテアーゼとして転写されることを示していた。また、real time PCR による発現量解析では、すべてが感染幼虫特異的に発現していることが明らかとなった。

ベネズエラ糞線虫の幼虫が宿主環境に適応するとともに発現が上昇する遺伝子を同定する目的で、感染幼虫におけるリード数がゼロであり、肺移行期幼虫でリード数が 50 を超えるものをリストアップした。

その結果 49 個の配列が相当し、ここには、フォークヘッドファミリーの転写因子、4 種類のアセチルコリンエステラーゼ（すべて同じ *C. elegans* アセチルコリンエステラーゼにヒット）、さらにまた 11 個のアスタシン様メタロプロテアーゼ（うち 10 個が NAS-34 にヒット）などが含まれた。

3. 組換え寄生虫抗原と患者血清との反応性

ブタ回虫の体内移行期幼虫の cDNA ライブラリから得られた 175 種類のユニークな配列のうち、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 に特に注目して組換え抗原を作製し、解析を進めた。

このふたつを選んだ理由は、両者とも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からである。予備的に両者の幼虫移行症患者血清との反応を検討したところ、As16 の方がブタ回虫感染と考えられる患者血清と強く結合したので、以降の実験には組換えブタ回虫抗原として As16 を用いた。

最初に 40 種類の幼虫移行症患者血清についてイヌ回虫幼虫 ES 粗抗原と As16 を反応させた。40 検体のうち 3 検体がイヌ回虫幼虫 ES に比べて As16 に強く反応しており、これらの血清はブタ回虫感染血清であることが強く示唆された。次にイヌ回虫幼虫 ES 粗抗原の代わりに組換え ES 抗原である TES32 を用いて同様の実験をおこなった。結果は、イヌ回虫幼虫 ES と完全に平行ではないものの、両者は同様の結合傾向を示した。以上より、どちらも組換え抗原である As16 と TES32 により、幼虫移行症の原因がトキソカラなのか、あるいはブタ回虫なのかという、病原体診断が可能であることが示唆された。

一方、診断用抗原として有望であるとの報告があった L3Nie 抗原では、組換えタンパク質を作製し酵素抗体法によって患者血清との結合を検討したが、糞線虫患者に特異的であるとの結果は得られなかった。

D. 考察

当教室で実施している寄生虫病血清診断の結果陽性と判定される症例の大多数は、食品媒介性の人獣共通寄生虫症である。具体的には肺吸虫症とイヌ回虫やブタ回虫による内臓幼虫移行症である。例年、両者で全体の 80%を超えている。

特にイヌ回虫やブタ回虫による内臓幼虫移行症は、臨床的には治療抵抗性の肺炎として現れるほか、中枢神経や眼症状もおこす可能性があり寄生虫の病原因子を探ることは治療の上からも重要である。本研究計画では、体内移行幼虫の生物学的特徴を探るためにモデル腸管寄生線虫であるベネズエラ糞線虫のトランスクリプトを次世代型シーケンサで解析し、これまでまったく報告のなかった発現情報を得ることができた。

現在までの解析において特筆すべき点は、アスタシン様メタロプロテアーゼが、ベネズエラ糞線虫にとってきわめて重要なタンパク質である可能性が指摘されたことである。その中でも *C. elegans* ではゲノム上に 39 個しか存在しない NAS (Nematode AStacin-like protease) 相同亜鉛結合性メタロプロテアーゼが 200 個以上存在し、しかもその多くがきわめて活発に、発育段階特異的に転写されている可能性が明らかになった。

今回の解析結果はコンピュータ上のアSEMBルとリード数解析が主だが、ゲノム PCR でも多種類の NAS-34 相同プロテアーゼがクローニングされており、これは多型性というよりは巨大遺伝子ファミリーの存在を伺わせる。なぜならば、実験に使用しているベネズエラ糞線虫は過去 20 年以上実験室内で継代されており、多数の多型を含むとは考えにくいからである。

さらに、アスタシン様メタロプロテアーゼは発現のタイミングが分子によりいろいろで、虫卵から成虫まで一貫して発現がみられるもの、肺移行期以降に発現しているもの、成虫でのみ見られるものなどがある。腸管寄生線虫の体内移行との関係で興味を引くのは、肺ステージのみで発現している 9 個のアスタシン様メタロプロテアーゼである。このような分子は体内移行の key molecule である可能性が高く、今後詳しく検討する価値がある。

以上より、ベネズエラ糞線虫が自由生活線虫に比べて数多くのマトリックスメタロプロテア

一ゼ遺伝子を保有していることは確実であり、その機能分化と寄生生活への適応との関係が注目される。肺移行期においてのみ発現がみられるマトリックスメタロプロテアーゼがあり、体内移行メカニズム研究の突破口になることが期待される。

一方、寄生虫疾患に血清診断への応用を目指しておこなわれた組換え抗原の実験は、現行の血清診断で問題となる、抗原供給や抗体の特異性の問題の解決策として実施された。組換えタンパク質であれば一定の品質の抗原を大量に準備することが可能であり、供給は安定する。さらに、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す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。

その結果、ブタ回虫の体内移行幼虫で発現がみとめられる As16 と、イヌ回虫症において一定の信頼性が証明されている TES32 の組み合わせにより、両者の結合特性は、分泌排泄抗原（ES 抗原）と似通っていることが示された。これは、組換え抗原を用いた幼虫移行症診断システムの開発が可能であることを示す。

糞線虫症においては組換え L3Nie 抗原を作製して患者血清との反応性を検討したが特異性に乏しく、診断抗原として使うことはできないことが明らかとなった。

E. 結論

モデル腸管寄生線虫であるベネズエラ糞線虫を用いた幼虫移行症のメカニズム解明のブレイクスルーとなるような、肺ステージのみで発現しているアスタシン様メタロプロテアーゼを特定することができた。

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 As16 とイヌ回虫の組換え診断抗原 TES32 の組み合わせで、幼虫移行症診断システムの開発が可能であることが示された。

F. 研究発表

著書

1. 丸山治彦 その他の吸虫症（肺吸虫症、肝吸虫症、横川吸虫症、肝蛭症）（今日の治療指針 2011、山口徹、北原光夫、福井次矢編）、pp.263-264、医学書院（東京）（2011年1月1日）

総説

1. 木村幹男、丸山治彦、三浦聡之：熱帯病・寄生虫症に対する研究班保管国内未承認薬 Medical Practice 27: 1565-1568, 2010
2. 丸山治彦：腹部症状（腹痛、下痢、下血など）（寄生虫の標的臓器別症状からすすめる実地診療－疑い、問診・診断から治療まで－） Medical Practice 27: 1496-1550, 2010
3. 丸山治彦 寄生虫検査（これだけは知っておきたい検査のポイント第8集）medicina 47 増刊号: 33-34, 2010

原著論文

1. Yoshida A, Nagayasu E, Nishimaki A, Sawaguchi A, Yanagawa S, Maruyama H.: Transcripts analysis of infective larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* Parasitol Int 60: 75-83, 2010
2. Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Maruyama H, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Kuroakwa M, Ogawa S, Yasutomo K, Chiba S: Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. Blood 117: 128-34, 2010

症例報告

1. Uni S, Boda T, Daisaku K, Ikura Y, Maruyama H, Hasegawa H, Fukuda M, Takaoka H, Bain O: Zoonotic filariasis caused by *Onchocerca dewittei japonica* in a resident of Hiroshima Prefecture, Honshu, Japan, Parasitol Int 59: 477-480, 2010
2. 安東加恵、榎原真由美、徳安彰子、明石哲彦、高谷恵子、丸山治彦：気胸・胸水から診断された肺吸虫症の1例 大分市医師会医学雑誌 アルメイダ医報 37: 2-6, 2010
3. 宮腰淑子、関谷可奈子、佐藤晶、五十嵐修一、山崎元義：好酸球性髄膜炎を呈したドロレス顎口虫症の1例 Clinical Parasitol 21: 73-76, 2010
4. 宇仁茂彦、保田智之、大作浩一、福田昌子、丸山治彦、長谷川英男、高岡宏行：イノシシに寄生する *Onchocerca dewittei japonica* による人体寄生例：広島県の症例を含むわが国の症例について Clinical Parasitol 21: 73-76, 2010
5. 山崎宙、山口浩司、佐田政隆、丸山治彦、松岡裕之：趾間部のマダニ咬傷後に足趾血行不良から壊死に陥った1例 Clinical Parasitol 21: 103-106, 2010

学会発表

1. 長安英治、伊藤武彦、小椋義俊、吉田彩子、林哲也、丸山治彦、ベネズエラ糞線虫のゲノム・トランスクリプトーム解析、第 79 回日本寄生虫学会大会（旭川）
2. 長安英治、吉田彩子、丸山治彦、ベネズエラ糞線虫トランスクリプトームシーケンシング、第 18 回分子寄生虫ワークショップ（草津）
3. 長安英治、小椋義俊、伊藤武彦、吉田彩子、林哲也、丸山治彦、第 9 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム（長崎）
4. Eiji Nagayasu, Ayako Yoshida, Haruhiko Maruyama, A bioinformatics approach to identify immunodiagnostic antigens for strongyloidiasis, 8th Asia-Pacific Travel Health Conference (Nara)
5. 長安英治、伊藤武彦、小椋義俊、吉田彩子、林哲也、丸山治彦ベネズエラ糞線虫のゲノム・トランスクリプトーム解析から見えてきたもの、第 4 回蠕虫研究会（宮崎）
6. Eiji Nagayasu, Yoshitoshi Ogura, Takehiko Ito, Ayako Yoshida, Tetsuya Hayashi and Haruhiko Maruyama, 45th Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases (Tokyo)
7. 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）
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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, Sep. 7-10, 2010, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Japan
12. 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
13. 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）

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

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 寄生原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、しかもその増殖に必要な不可欠である事から特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる。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。これまでの研究で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須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、寄生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可能性があると予想された。実際に昨年度までの研究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。その結果エキノкокスでは実際に NADH-フマル酸還元酵素系が機能し、阻害剤の効果から少なくとも幼虫の生存に必須であることが明らかになった。しかも NADH-フマル酸還元酵素系の末端酸化酵素である複合体 II

のフマル酸還元酵素活性は回虫成虫の活性よりさらに高い値を示した。そこでエキノコックス複合体の特徴を調べる目的でミトコンドリアより複合体 II の精製を試み、各サブユニットの N 末端解析および PCR を用いたホモロジープロービングから全てのサブユニットおよび複合体 II の生合成に関わるアセンブリーファクターの cDNA のクローニングを行なった。

(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. エキノコックス複合体 II の精製と N 末端分析

複合体 II は細菌では細胞質膜に、また真核生物ではミトコンドリア内膜に局在しており、基本的に 4 つのポリペプチドから構成されている。分子量約 70 kDa の最も大きいサイズのサブユニット (Fp) は補欠分子族として FAD を含み、これと分子量約 30 kDa で 3 種の異なるタイプの鉄-イオウクラスターを含む Ip サブユニットから比較的親水性の触媒部位が形成されている。この触媒部位は SQR ではコハク酸からフェナジンメトスルフェート (PMS) など水溶性の電子受容体への、逆に QFR では水溶性の電子供与体である還元型メチルビオロゲンからフマル酸への電子伝達を担っている。この触媒部位が膜に安定に局在するためには 2 つの小さな疎水性のサブユニットが必要であり、多くの生物種の酵素でヘム b を含むことからシトクロム b サブユニット

(CybL および CybS) と呼ばれている。シトクロム b は複合体 II とユビキノノンやロドキノノンなど膜中に存在する疎水性の電子伝達成分との電子の受け渡しに必要であり、複合体としてはシトクロム b が膜アンカーとして膜内に局在し触媒部位はマトリックス側に突出した形をとっている。

これまでの研究で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、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。しかしその量は極めて少なく、カラムクロマトグラフィーを用いた通常の方法では複合体 II を精製する事は困難であった。そこで微量のタンパク質複合体を活性を保持したままの状態 で分離する事が可能な High resolution Clear Native Electrophoresis (hrCNE) を用いた精製法の確立を試みた。

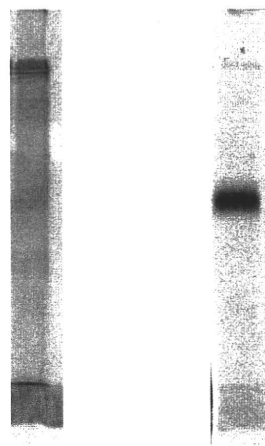


図 1 hrCNE によるエキノコックス複合体 II の精製

左はクマシーブリリアントブルーによるタンパク質の染色。右はコハク酸脱水素酵素による活性染色。

その結果図 1 に示す様に活性染色で単一

のバンドとしてエキノコックス複合体を精製する事ができた。そこでこの条件で Prepforesis (ATTO) を用いた調製用電気泳動を行ない精製した標品を二次元に展開し、全てのサブユニットを分離して N 末端分析を行なった。

2. エキノコックス複合体 II 全サブユニットおよびアセンブリーファクター cDNA のクローニング

最近、複合体 II を構成する上記の 4 サブユニット以外に複合体 II のアセンブリーに必要な 2 種のタンパク質が哺乳類ミトコンドリアで報告され、それぞれ Succinate dehydrogenase assembly factor (SDHAF) として SDHAF1、SDHAF2 と名付けられた。そこで、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 断片が増幅し、それぞれについてクローニング、配列決定を行なった。その結果、全てのサブユニットと SDHAF1、SDHAF2 の完全長 cDNA の塩基配列を決定する事ができた。各サブユニットの配列はペプチドより決定した N 末端のアミノ酸配列を含み、またこれらの配列は報告されている同じ扁形動物に属する住血吸虫の配列に最も近かった。興味深い事に 2 種の Ip の存在が明らかになった。また SDHAF1 は mmp37 (mitochondrial matrix protein 37) と融合していた。

D. 考察

エキノコックス症はその治療にアルベンドazole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。

今回複合体 II の精製に用いた hrCNE はエキノコックス等微量な試料しか入手できない場合に非常に有用な分離システムであり、その応用範囲は広い。実際に我々の研究グループではやはり微量な試料しか得る事のできない宿主体内移行中のブタ回虫の幼虫やマラリア原虫のミトコンドリア酵素の解析に用いている。

我々は回虫成虫の酵素に関して、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めており、回虫成虫複合体 II を特異的に阻害するフルトラニルが CybL の Trp69 と C-H π 相互作用している事を見出しているが、エキノコックスでは哺乳類同様にメチオニンで

あり、ミトコンドリアを用いて調べた酵素活性がフルトラニルで阻害されない結果を説明する事ができる。一方 Ip などに哺乳類と異なるアミノ酸配列が見出され、今後の解析により構造予測からエキノコックスの酵素を特異的に阻害する化合物をインシリコで探索する事が可能になった。

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、今回の結果から各サブユニットにおける相違がアミノ酸レベルで明らかになり、これを標的とした新規薬剤開発の可能性が一層高くなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. Acta Crystallographica (2010) F66, 275-278

- 2) Divergence of mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Hikosaka, K., Watanabe, Y., Tsuji, N., Kita, K., Kishine, 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
- 4) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

蠕虫の腸管感染排除機構の解明

中西憲司 兵庫医科大学

研究要旨

昨年度までに我々は好塩基球が抗原提示細胞として Th2 細胞を誘導できることを明らかにした。しかし、蠕虫感染に対して好塩基球がどのような役割を果たすのかは不明である。本研究では好塩基球欠損マウスを用いて、蠕虫排除における好塩基球の働きを検討した。その結果、好塩基球が欠損すると、腸管内での蠕虫の感染が著しく遷延す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では Th2 型免疫応答が誘導され、特に肝臓や脾臓において好塩基球の数が著明に増加する。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 型免疫応答誘導能と蠕虫排除における役割を解明することを目的に研究した。

B. 研究方法

好塩基球欠損マウスの作製：

①正常マウスに抗 FcεR1α抗体(MAR-1)

を投与し、好塩基球を除去する。あるいは、好塩基球特異的 Diphtheria toxin(DT) receptor 発現マウス(Bas-TRECK)に DT を投与し、好塩基球を除去する。

Strongyloides venezuelensis(Sv)排虫実験：野生型マウス、または好塩基球欠損マウスに Sv の 3 型幼虫を経皮感染させたマウスから糞便を連日採取し、この中に現れる虫卵数を計測する。虫卵が検出されなくなった時点を排虫完了日とする。この実験によりマウスの Sv 排虫能における好塩基球の必要性を明らかにする。

Th2 型免疫応答誘導に対する好塩基球の影響：

1) Sv 感染 7 日目の野生型マウス、または好塩基球欠損マウスの腸間膜リンパ節細胞を採取し、抗 CD3/抗 CD28 抗体で刺激をして細胞内 IFNγ/IL-4 を染色して FACS で調べる。

2) Sv 感染前後の野生型マウス、または好塩基球欠損マウスの血清を経時的に採取し、血清中 IgE と粘膜型肥満細胞マーカー mMCP-1 の値を ELISA にて測

定する。

1)、2)より蠕虫感染に伴う Th2 細胞誘導、IgE 産生、粘膜型肥満細胞誘導における好塩基球の役割を明らかにする。

(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

MAR-1 処置マウス、Bas-TRECK マウスのいずれの好塩基球を欠損したマウスでも、Sv を感染させた場合、排虫時期が野生型マウスに比べて著しく遅延した。このときの腸間膜リンパ節 T 細胞からのサイトカイン産生、血清中 IgE 産生、粘膜型肥満細胞の誘導には好塩基球の有無で変化は認められなかった。

研究発表

■著書■

安田好文, 中西憲司. 寄生虫に対する粘膜免疫. 清野宏 編. 臨床粘膜免疫学. 東京:シナジー, 2010:522-529

■学術論文■

[総説]

中西憲司. IL-18 とユニークなアレルギー. ファルマシア 2010;46:55-59.

中平雅清, 中西憲司. Super Th1 細胞/IL-18 による非 IgE 炎症と気管支喘息. 呼吸 2010;29:37-43.

松本真琴, 中西憲司. IL-18 と免疫疾患. Fronti Rheumatol Clin

D. 考察

好塩基球欠損マウスでは感染が著しく遷延したことから、蠕虫感染防御における好塩基球の重要性が明らかとなった。しかし、そのメカニズムは蠕虫特異的 Th2 細胞の誘導よりも、むしろ腸管での効果相で作用していることが考えられる。そのメカニズムとして、IgE/FcεRIα を介した好塩基球の活性化が考えられ、今後、この関連を明らかにしていきたい。

E. 結論

今回の研究で、Sv 感染時に好塩基球は、Th2/IgE 誘導する抗原提示細胞としての役割よりも、寄生虫の排除機構に、大きく関与することが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当せず。

Immunol4 2010:37-43.

中西憲司. 好塩基球によるアレルギー性炎症の誘導と憎悪. アレルギー 2010;59:251

筒井ひろ子, 中西憲司. 自然型アレルギー. 侵襲と免疫 2010;19:85-86.

善本知広, 中西憲司. アレルギーと IL-18/IL-33. 実験医学 2010;28:1975-1981.

小坂久, 善本知宏, 中西憲司, 藤元治朗. 腹腔内術後癒着形成における IFN-γ の重要性. 炎症と免疫 2010;18:531-537.