

表-1、各種消化管原虫類に対する蛍光抗試薬の反応性比較

Parasite tested	国内開発抗体	Merifluor C/G
<i>G. intestinalis</i>	++	++
<i>G. muris</i>	+	±
<i>C. hominis</i>	++	++
<i>C. parvum</i>	++	++
<i>C. meleagridis</i>	±~+	±~+
<i>C. felis</i>	+	+
<i>C. muris</i>	±	±
<i>Cyclospora</i>	-	-
<i>Eimeria</i>	-	-
<i>Retortamonas</i>	-	-
<i>Chilomastix</i>	-	+
<i>Ent. histolytica</i>	-	-
<i>Ent. coli</i>	-	-

++:陽性、+:弱陽性、±:弱陽性と陰性が混在、 -:陰性

表-2、ヒト糞便試料に対する蛍光抗体検査結果

<i>Giardia</i> 陽性試料		Merifluor C/G		<i>Cryptosporidium</i> 陽性試料		Merifluor C/G	
		陽性	陰性			陽性	陰性
国内 開発 抗体	陽性	6	0	国内 開発 抗体	陽性	7	0
	陰性	0	10		陰性	0	10

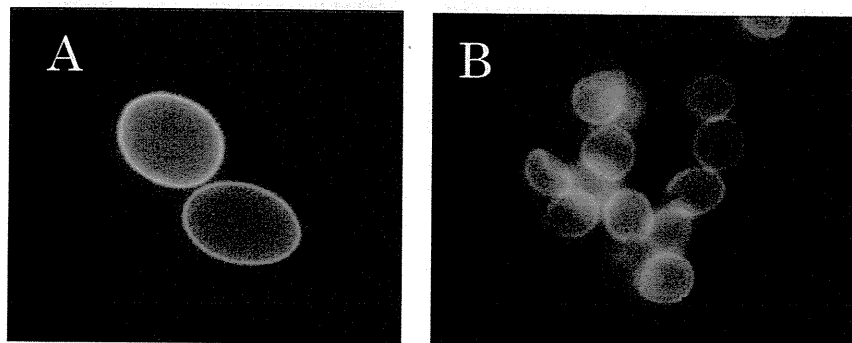


図-1、国内開発蛍光抗体試薬で染色した *Giardia intestinalis* シスト(A) ならびに *Cryptosporidium parvum* オーシスト(B)

マラリア薬剤耐性株流入のモニタリング法の開発

研究分担者： 中野由美子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

ピリメサミン (Pyr) はクロロキンに代わる抗マラリア薬として 1990 年代からアフリカで広く使用されている。一方で、アフリカを含む世界中でピリメサミン耐性原虫が出現している。本研究ではピリメサミン耐性の広まりを解析し、今後の対策に役立てるために、1984 年から 1998 年までのアフリカのサンプルから Pyr 耐性遺伝子 (*dhfr*) の遺伝子型を決定した。その結果、多くのサンプルで異なる耐性型の混合感染が発見された。また、1990 年代に急速に耐性型の遺伝子型が出現したことを示した。

A. 研究目的

1950 年代後半に東南アジアならびに南アメリカで発生したクロロキン (CQ) 耐性熱帯熱マラリア原虫は 1978 年にアフリカ東部に広まった。その後ピリメサミン (Pyr) が 1970 年代からタイで CQ に代わる一次選択薬として使用されたことから、直後に Pyr 耐性が報告され、アフリカにも 90 年代以降に Pyr 耐性が報告されるようになった。その後 Pyr 耐性遺伝子として葉酸合成酵素系の酵素 difydrophosphate reductase (*dhfr*) が同定されたのは 1997 年である。Dhfr の 108 番目のセリンがアスパラギンに置換であることが解明され、さらに変異が二重、三重、四重に入ることによりでの薬剤耐性活性は大きくなることが証明されている。さらに、これらの耐性はインドシナ半島と西大西洋諸国で独立に発生し、インドシナ半島の耐性株がアフリカに移入したことが証明されている。以上の報告は熱帯熱マラリア原虫の耐性遺伝子が比

較的短時間で地理的に拡散したことを示している。このような 1990 年代までの世界の薬剤耐性の流行の歴史は、これまで *in vivo* test (treatment failure), と *in vitro* test の報告から推察されてきた。しかし多重変異の出現の歴史や、アフリカのようなマラリアに免疫のある地域では *in vivo* 耐性と耐性遺伝子の存在が相関しない。よって耐性の遺伝子型の起源と歴史を明らかにするために、アーカイブ標本を用い、1980 年代にさかのぼり、アフリカに存在していた *dhfr* の遺伝子型を決定した。

B. 研究方法

1984 年から 1998 年に旧予防衛生研究所が行っていた伝染病予防法によるマラリア行政検査によって収集したマラリア輸入例の薄層標本を用いた。

ギムザ染色のアーカイブ標本はメタノールで脱色したのち、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen 社) で DNA を回収した。

バルサム封埋した標本はキシレンに一昼夜浸すことによりカバーガラスを除去したのち、メタノールで脱色を行った。*Dhfr* 変異を含む 190 bp の DNA 断片は Phusion polymerase (NEB) を用いてネステッド PCR で増幅した。1 回目の増幅は 98°C 5 秒、45°C 20 秒、72°C 20 秒の増幅を 40 サイクル行い、2 回目のネステッド PCR には 1 回目の PCR で得られたサンプルを 1ul 用い、98°C 5 秒、45°C 20 秒、72°C 20 秒の増幅を 30 サイクル行った。使用したプライマーの配列は (i) アミノ酸 51、59 番を含む 190bp の増幅には 21F (5' -GCC ATA TGT GCA TGT TGT AAG GTT GAA AGC-3') と 22R (5' -CTT ATA TTT CAA TTT TTC ATA TTT TGA TTC-3') を outer primers とし、23F (5' -TGT TGT AAG GTT GAA AGC AAA AAT GAG GGG-3') と 24R (5' -TTT TTC ATA TTT TGA TTC ATT CAC ATA TGT-3') を inner primers とした; (ii) アミノ酸 108 番を含む 190bp の増幅には 25F (5' -TGT AAA TAT TTA AAC AAA GAA ACT GTG GAT-3') と 26R (5' -TTC ATC AAA ATC TTC TTT TTT TAA GGT TCT-3') を outer primers とし、27F (5' -GAA ACT GTG GAT AAT GTA AAT GAT ATG CCT-3') と 28R (5' -TTC TTT TTT TAA GGT TCT AGA CAA TAT AAC-3') を inner primers とした; (iii) アミノ酸 164 番を含む 190bp の増幅には 29F (5' -GAA GAT TTT GAT GAA GAT GTT TAT ATC ATT-3') と 33R (5' -AAA TAC ATC ACA TTC ATA TGT ACT ATT TAT-3') を outer primers とし、31F (5' -GTT TAT ATC ATT AAC AAA GTT GAA GAT CTA-3') と 34R (5' -ACA TTC ATA TGT ACT ATT TAT TCT AGT AAA-3') を inner primers とした。

PCR 産物の配列決定は、オペロンバイオテクノロジー (株) に外部依頼した。

シーケンスの結果、51 と 59 番目の残基のピークが二重であったサンプルについては、pT7blue プラスミド (Novagen) にクローニングし、10 個以上のクローンをさらにシーケンスすることで、51 と 59 番目の変異の混合感染を確認した。3 種の PCR 産物間で、変異の linkage が確認できないものについては、解析結果から排除した。

1995 年以前と以降の薬剤耐性遺伝子の分布は Fisher の有為検定を行った。p 値が 0.05 以下の場合、有為であると見なした。

C. 研究結果

アフリカ由来の 128 サンプルのうち 62 サンプルが DNA の回収と *dhfr* locus の増幅が可能であった。ダイレクトシーケンスの結果では、東南アジアの株は 1 種のシーケンスの波長として結果が得られていたが、アフリカのサンプルは 42 サンプル (全体の 67%) が二重の波長を示し、異なる遺伝子型の原虫が混合感染していることがわかった。PT7 プラスミドにクローン化して解析した結果と合わせると、アフリカでは 1980 年代には N51 あるいは C59 に変異の入った単独変異 (NRSI, ICSI) が存在していた。また両方に変異を有する IRSI が検出された。これらの遺伝子型は S108N 変異を持たないため、ピリメサミンに対して感受性をしめす。感受性型 (NCSI, ICSI, NRSI, IRSI) は 1984 年から 1994 年までは検出されたが、1995 年以降は減少した。 ($p < 0.0001$, Fisher

有為検定)。一方で、S108N 変異を有する遺伝子型 (NCNI, ICNI, NRNI, IRNI) は 80 年代に存在せず、1991 年以降から同定された。マラウイでは 1993 年より Pyr を第一次選択薬として大量に使用したが、それ以前に耐性型変異がアフリカに存在していたことを示す。二重変異 ICNI は 1991 年以降アフリカ東部と西部で、NRNI は 1995 年以降アフリカ西部と北部で同定された。この結果は、NRNI が現在のアフリカ西部を起源としている報告 (Mita, 2009) と一致した。

D. 考察

混合感染をした PCR 産物のプラスミドへのクローン化によって Pyr の遺伝子型を正確に同定することができた。また NRSI, ICSI, IRSI は 1980 年代のアフリカに存在していただけでなく、現在でも非常にわずかながらフィールドで単離されている (Mockenhaupt, 2001, Kyabayinze, 2003 AJTMH)。このような遺伝子型は東南アジアでは同定されず、アフリカ独自の感受性型の多型だと考えられる。

これまでの文献によるアフリカにおける三重変異同定は、の 1991 年になった。マラウイでは 1993 年より Pyr を第一次選択薬として大量に使用したが、それ以前に三重変異がアフリカに存在していたことを示す。この三重変異が、東南アジア表、アフリカにおける *dhfr* の遺伝子型

起源なのか、それともアフリカ起源の二重変異より発生したのか結論するには、マイクロサテライト解析による詳細な解析が今後、必要となろう。

E. 結論

アフリカにおける *dhfr* の遺伝子型は 1980 年代には感受性が存在していた。1991 年以降に耐性型原虫が広まるとともに、感受性型原虫は減少した。半数以上のサンプルは異なる遺伝子型の混合感染であった。以上のことは Pyr の使用が 1990 年代に拡大したことと相関すると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

Saito-Nakano, Y., Tanabe, K., Mita, T. (2011) Identification of pyrimethamine- and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa between 1984 and 1998: genotyping of archive blood samples. *Malaria Journal* 10:388.

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

赤痢アメーバの薬剤耐性機構の解明

分担研究者 津久井久美子 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨 赤痢アメーバ症は発展途上国のみならず、日本においても重要な腸管寄生原虫症である。しかし選択薬が少なく、薬剤耐性株の出現が危惧される。本研究では抗赤痢アメーバ薬として使用されるメタロニダゾールに対する耐性株を実験室で作成し、その性質の変化と遺伝子発現の変化から、薬剤耐性株出現機構を明らかにすることを目指した。

A. 研究目的

Entamoeba histolytica 感染によって起こるアメーバ症には投薬治療が必須である。現在アメーバ症治療に用いられる薬剤のうち、5-ニトロイミダゾールであるメタロニダゾール (metronidazole: MTZ) が第一選択薬として広く用いられている。MTZ による治療は通常非常に効果的であり、高濃度の薬剤に対する耐性株の報告は現在までされていない。しかし治療抵抗性の患者の存在は報告されている。さらに実験室での *E. histolytica* MTZ 耐性株作成についての議論はすでにされている。同時に *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis* spp, *Neisseria gonorrhoeae* や、いくつかの嫌気性細菌で臨床や実験室での MTZ 耐性が報告されている。このような状況から、赤痢アメーバについても MTZ 耐性株出現が危惧されている。もしこのような状況になれば人々の健康や経済に及ぼ

す影響は大きい。近年毎年世界で 500 万の感染例があり、そのほとんどが感染症に対して脆弱な発展途上国の子供たちである。また、日本においてもアメーバ症は増加傾向にあり、年間 800 例程度の報告がある。これらの治療はやはり MTZ により行われるため、耐性株の出現は世界のみならず、日本においても脅威である

本研究では 12 μ M の MTZ に耐性な赤痢アメーバ株を作成した (MTZR 株)。この耐性株の表現型とトランスクリプトームを野生型と比較することで病原性に関与する表現型の変化と薬剤耐性に関与する遺伝子の発見を目指した。トランスクリプトームに関しては MTZR 株と MTZR 株を MTZ 非存在下培養した株 [MTZR(-)] と MTZ に曝した野生株 (HM-1 株) との比較を行った。また、トランスクリプトーム解析から同定した遺伝子産物の重要性を評価するため、候補遺伝子を強発現させた株を作成し、薬剤耐性を検討した。

B. 研究方法

1. MTZ 耐性株の作成

MTZ 耐性赤痢アメーバ株は標準株である HM-1 株に $2\mu\text{M}$ の MTZ を加え、対数増殖期まで培養し、続いて $1\mu\text{M}$ ずつ濃度を上げた MTZ を加えた培地での培養を続けることで樹立した (MTZR)。

2. 表現型の検討

得られた MTZR 株について、以下の表現型を検討した。1) 増殖曲線、2) 細胞サイズ、3) 細胞接着能、4) 貪食効率、5) 動物細胞への障害活性、6) プロテアーゼ含有量、7) グルコース代謝活性、8) 他種抗アメーバ薬への耐性。

1) 増殖曲線は 6×10^4 個の HM-1 株・MTZR 株を 6mL の培地で $12\mu\text{M}$ の MTZ 存在下もしくは非存在下培養し、24 時間ごとの細胞数を 5 日間数えた。2) 細胞サイズについては $12\mu\text{M}$ の MTZ 存在下もしくは非存在下 24 時間培養した HM-1 株・MTZR 株を FACS Calibur にて解析した。3) 細胞接着能については以下のような実験を行った。200 μL あたり 1×10^4 個となるように BIS 培地に調製した細胞をヒトフィブロネクチンまたはコラーゲンタイプ I でコートされた 96 ウェルプレートに撒き、氷上で 10 分、続いて嫌気条件下 35.5°C で 15 から 90 分培養し、非接着細胞を除き、プレート上に接着細胞のみ残るようにした。続いてウェル内の細胞数を WST-1 試薬にて測定した。WST-1 は細胞に吸収されると生細胞でのみ活性があるコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素、によって formazan 色素を精製する。この吸収を OD450 で測定した。4) 貪食効率については、ナイルレッド標識されたカルボキシル化ビーズの貪食効率を、FACS Calibur にて解析した。5) 動物細胞への障害活性は、1 ウェルあたり 1×10^4 個の CHO 細胞を接着させた 96 ウェルプレートに、1 ウェルあたり 1×10^4 個の HM-1 株または MTZR 株を 15 分から 120 分共培養し、浮遊細胞とアメーバを除き、接着した CHO

細胞の数を WST-1 試薬にて評価した。6) プロテアーゼ含有量はゼラチン財モグラフィにて評価した。HM-1 株・MTZR 株の細胞祖抽出液 20 μg を 0.1% ゼラチンを含む 12% SDS-PAGE ゲルに還元非存在下で電気泳動し、ゲルを 2.5% TritonX-100 で 1 時間振盪して SDS を除いた。続いて 100mM Sodium acetate (pH4.5), 1% TritonX-100, 20mM DTT を含むバッファーで 3 時間酵素反応させた。プロテアーゼ活性はゲルを CBB 染色し、ゼラチンが分解されて染色されなくなったバンドの大きさで評価した。7) グルコース代謝活性は 1×10^7 個の HM-1 株・MTZR 株を 6 ウェルプレートに撒き 12 から 24 時間培養した培養上清について、グルコース含有量を Glucose (GO) assay kit (Sigma) にて測定した。8) 他種抗アメーバ薬への耐性については、100 μL の BIS 培地あたり 1×10^4 個の HM-1 株・MTZR 株を 96 ウェルプレートに撒き、 35.5°C 1 時間培養した。Chloroquine, emetine, metronidazole, omidazole, paramomycin, tinidazole, hydrogen peroxide を 2 倍希釈で加えていき、24 または 48 時間培養し、生細胞数を WST-1 試薬にて測定し、 IC_{50} (GraphPad Prism 5.0 の sigmoidal dose-response equation にて算出) と resistance index [$(\text{IC}_{50} \text{ of MTZR}) / (\text{IC}_{50} \text{ of HM-1})$] を求めた。

3. トランスクリプトーム解析

MTZR 株と MTZR 株を MTZ 非存在下培養した株 [MTZR(-)] と MTZ に曝した野生株 (HM-1 株) との比較を行った。各細胞から Trizol 試薬を用いて RNA を調製、MessageAmp TM premier RNA Amplification kit (Applied Biosystems) により 2 回独立に cRNA の作成を行い、Affymetrix 社カスタムアレイ Eh_Eia520620F に Affymetrix GeneChip Expression Analysis Technical Manual 1 に沿ってハイブリダイズし、データを得た。生データ

は GeneChip Operating Software (GCOS) と Gene Titan instrument form Affymetrix により得た。各遺伝子の発現量は R/BioConductor と GeneSpring GX ver 11.5 により解析した。データの再現性はピアソンの積率相関係数と主成分分析にて解析した。二回のデータ両方で GCOS での評価が present となった遺伝子についてのみ評価した。サンプル間での発現量の差が 3 倍以上、危険率 0.05 以下

(Benjamin-Hochberg 法により数値補正を行った後の Welch' s t-test にて算出) の遺伝子について発現に差がある遺伝子とした。サンプル間の差の優位性については Tukey' s honestly significant difference test により行った事後比較により評価した。また、プローブ名に " _x_at" が付いている他種遺伝子とのクロス反応が予想されるプローブと重複配列については解析から除外した。

4. MTZ 耐性に関する候補遺伝子強発現株の作成と MTZ 耐性の評価

トランスクリプトーム解析より有意に MTZR 株で発現上昇がみられ、MTZ 耐性に重要と考えられた HP-1 (hypothetical protein-1, EHI_006850), ISF1 (Iron-Sulfer flavoprotein-1, EHI_138480), ISF2 (Iron-Sulfer flavoprotein-2, EHI_025710), ISF4 (Iron-Sulfer flavoprotein-4, EHI_022600) の 4 遺伝子について、HA タグを付した融合遺伝子として HM-1 株に強発現する形質転換体を作成した。外来遺伝子発現量を定量 PCR にて評価し、MTZ、過酸化水素への耐性を前述の薬剤に対する IC₅₀ の評価方法に準じて評価した。

C. 研究結果

1. MTZ 耐性株の作成

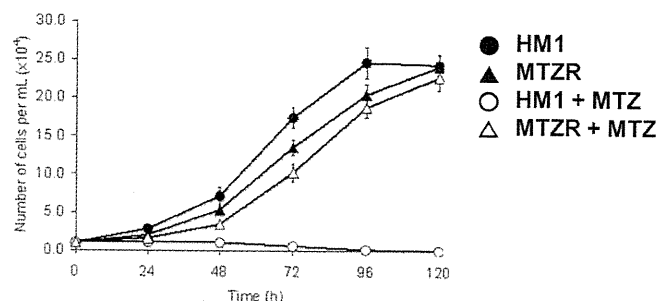
最終的に 12 μM の MTZ に耐性となる株を確立した。4 μM までは対数増殖期に至るのに 2~4 週間を要した。12 μM

の MTZ 存在下増殖する株を得るまでに 28 週または 196 日を要した。

2. 表現型の検討

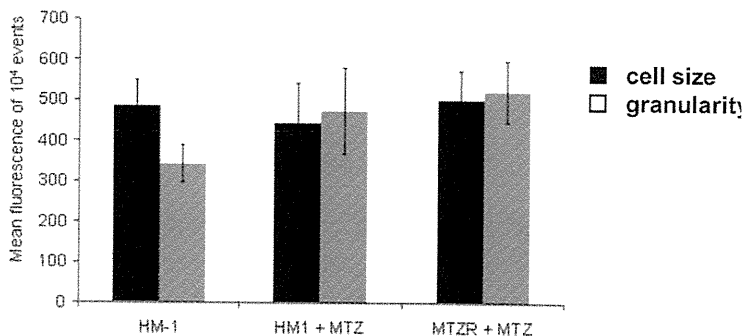
得られた MTZR について以下の表現型を野生型と比較した。

1) 増殖曲線



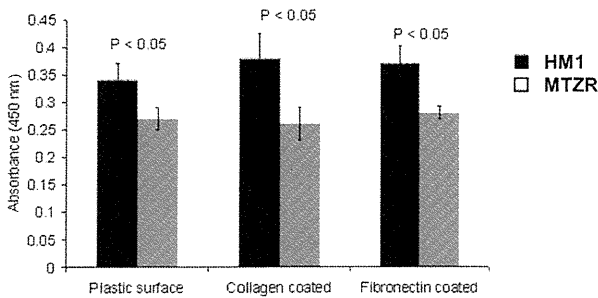
HM-1 株では 12 μM の MTZ 存在下では細胞の増殖が見られないが、MTZR 株では MTZ 存否に関わらず同程度の増殖が見られ、耐性株であることが確認された。

2) 細胞サイズ



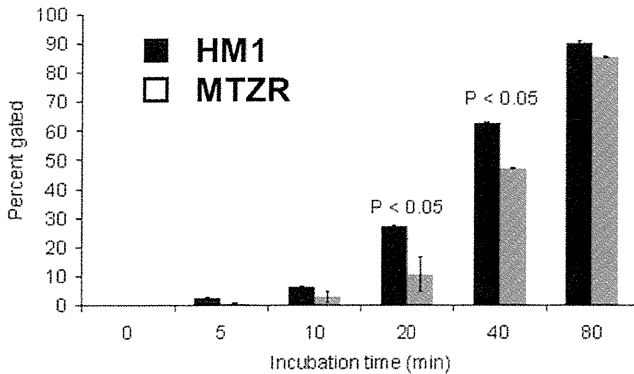
細胞のサイズ (FSC) と細胞の複雑さ (SSC: granularity) を評価した。MTZR 株では黒で示す細胞サイズが HM-1 株より大きいことが示された。また灰色で示す細胞の複雑さも MTZR 株で増加した。

3) 細胞接着能

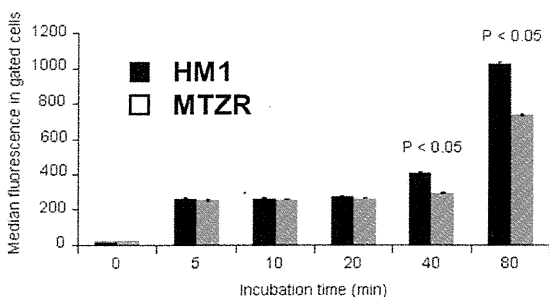


接着能力について、コートされていないプラスチック表面、コラーゲンコート、フィブロネクチンコート、どの実験においても MTZR 株は有意に HM-1 株よりも弱い接着性を示した。

4) 貪食効率



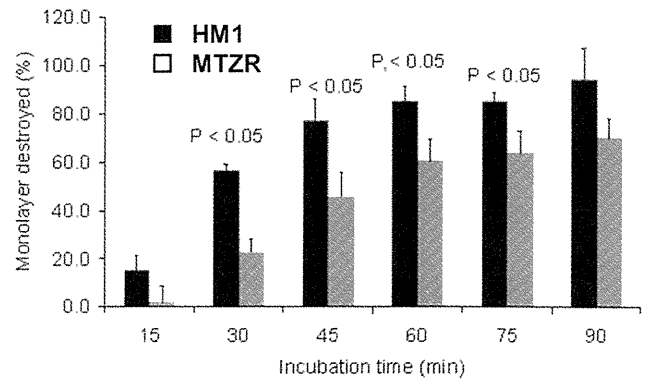
まず、ビーズを貪食した細胞の%の変化を示す。これより時間を経るにつれ、ビーズを貪食した細胞の%が上昇するが、その上昇率は MTZR 株で HM-1 株より遅く、特に 20 分、40 分で有意に減少した。しかし長時間の培養では%の変化は見られなくなった。



次にビーズを貪食した細胞集団における蛍光の平均値を示す。40 分 80 分で HM-1 株で有意な上昇がみられた。これは MTZR 株では貪食されるビーズの数が少ないことを反映していると考えられる。

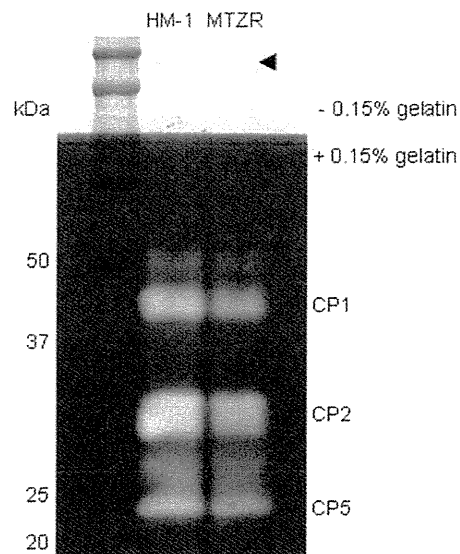
最初の結果と合わせ、MTZR 株では貪食能力が減少していることが示唆された。

5) 動物細胞への障害活性



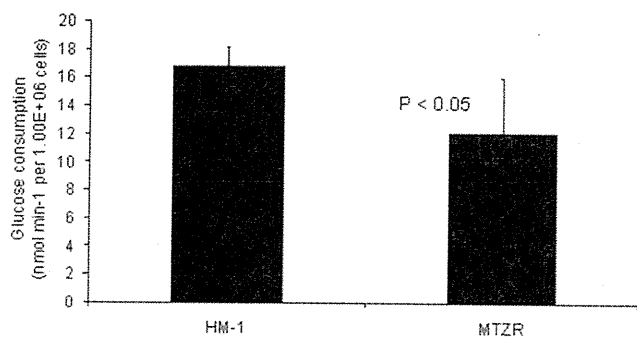
CHO 細胞への細胞障害活性は MTZR 株ですべての時間で減少しており、特に 30、45、60、75 分で有意であった。

6) プロテアーゼ含有量



プロテアーゼ活性はゲルの白く抜けたバンドの大きさで評価した。MTZR株でCP1, CP2, CP5に相当するバンドの濃さが減少しており、プロテアーゼ活性が減少していることが示唆された。

7) グルコース代謝活性



培養上清のグルコース量を測定したところ、MTZR株でのグルコース代謝量が有意に減少していることが示された。

8) 他種抗アメーバ薬への耐性

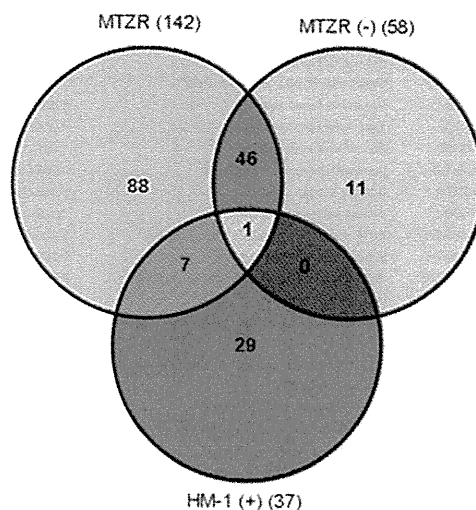
Compound	Description	HM-1	MTZR	RI*
chloroquine	Amebicide	1562.7 ± 0.3	3125.3 ± 0.4	2.0
metine	Amebicide	12.8 ± 0.3	50.3 ± 0.3	3.9
etronidazole	Amebicide	6.5 ± 0.3	12.9 ± 0.3	2.0
rnidazole	Amebicide	6.5 ± 0.3	12.3 ± 0.3	1.9
aromomycin	Amebicide	12.6 ± 0.4	25.1 ± 0.3	2.0
nidazole	Amebicide	12.6 ± 0.2	24.9 ± 0.3	2.0
ydrogen peroxide	Stress inducer	244.2 ± 0.4	488.1 ± 0.3	2.0

表に示すように他種抗アメーバ薬への耐性はMTZR株で常に上昇しており、おおむねHM-1株の2倍の耐性度があらることが示された。

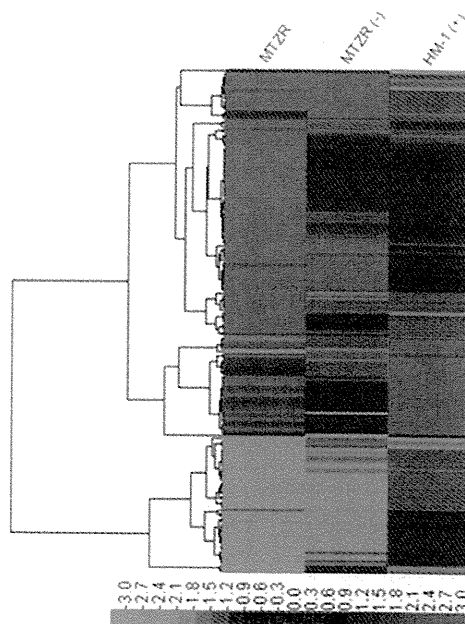
3. トランスクリプトーム解析

MTZR株とMTZR株をMTZ非存在下培養した株[MTZR(-)]とMTZに曝した野生株(HM-1株)との比較を行い、各サンプルで有意に発現変化が起きていた遺伝子をベン図に示す。これより、MTZR株で変化した遺伝子はHM-1株をMTZ処理したサンプルとは異なるセットの遺伝子あることが明らかとなっ

た。



さらにヒートマップを示す。これよりMTZR株で変化のあった遺伝子のほとんどが赤で示す発現上昇を起こしていることがわかる。



続いてMTZR株(MTZ+)で発現上昇した遺伝子と発現が減少した遺伝子のうち、遺伝子のアノテーションがされているもののリストを示す。

Probe SetID	NCBI RefSeq	Gene name	P-value	Fold-change
EHI_184190_at	XM_001613885.1	DNA polymerase, putative	2.80E-03	12.9
EHI_025710_at	XM_644279.1	Iron-sulfur flavoprotein, putative	4.60E-05	11.6
522.m00018_at	XM_643100.1	AlG1 family protein*	6.50E-04	11.5
EHI_186980_at	XM_647238.1	ADP-ribosylation factor 1, putative	9.20E-04	7.2
EHI_026000_s_at	XM_643099.1	AlG1 family protein, putative	2.80E-03	6.5
EHI_128480_at	XM_650038.1	Iron-sulfur flavoprotein, putative	6.50E-04	6.3
EHI_073680_s_at	XM_648498.1	Seine-rich 25 kDa antigen protein*	1.10E-02	6.2
EHI_022270_s_at	XM_644761.1	Iron-sulfur flavoprotein*	1.60E-02	5.5
EHI_128980_at	XM_646723.1	Type A flavoprotein, putative	1.00E-02	5.4
EHI_022600_s_at	XM_643189.1	Iron-sulfur flavoprotein	1.40E-02	5.4
EHI_181710_s_at	XM_001914610.1	Iron-sulfur flavoprotein, putative	1.30E-02	5.3
82.m00157_s_at	XM_648374.1	Surface antigen aieI1	6.20E-03	5.3
EHI_067770_at	XM_650589.1	Acetyltransferase, putative	1.30E-02	4.9
EHI_072600_s_at	XM_001914217.1	dUTP nucleotidohydrolase domain protein*	3.20E-02	4.9
EHI_067720_s_at	XM_643101.1	Iron-sulfur flavoprotein, putative	5.30E-04	4.8
EHI_072000_s_at	XM_001913948.1	Seine-rich 25 kDa antigen protein, putative	9.40E-03	4.8
EHI_103280_s_at	XM_001913934.1	Iron-sulfur flavoprotein	2.30E-02	4.5
82.m00164_s_at	XM_648353.1	Seine-rich 25 kDa antigen protein*	4.10E-02	4.1
EHI_074750_at	XM_644490.1	Ras family GTPase	3.80E-04	3.9
EHI_148550_at	XM_652392.1	Protein tyrosine kinase domain-containing protein	4.10E-02	3.8
432.m00028_at	XM_643464.1	AlG1 family protein*	2.70E-04	3.7
EHI_075660_at	XM_643678.1	CAAX prenyl protease, putative	1.70E-04	3.6
EHI_075150_at	XM_643772.2	NAD-specific glutamate dehydrogenase, putative	6.10E-03	3.6
EHI_128550_at	XM_643463.2	AlG1 family protein, putative	2.00E-03	3.5
EHI_082000_at	XM_648622.1	Leucine rich repeat protein, BspA family	1.00E-02	3.4
36.m00218_s_at	XM_649994.1	Tartrate ABC transporter, putative	4.90E-02	3.3
EHI_147020_at	XM_644819.1	Ser/Thr protein phosphatase family protein	9.30E-04	3.3
EHI_082100_at	XM_649470.1	Chitinase, putative	4.10E-02	3.2
EHI_046450_at	XM_652204.1	Ras family GTPase	8.70E-04	3.1
EHI_028620_s_at	XM_642949.1	Aldose reductase, putative	1.20E-03	3.1
EHI_118410_at	XM_644811.1	Tyrosine Kinase, putative	7.20E-03	3.1
EHI_075640_at	XM_001914330.1	Protein phosphatase domain-containing protein	2.10E-02	3.1
EHI_046600_at	XM_648507.1	Ras family protein	2.30E-02	3.1
EHI_128550_at	XM_001914189.1	AlG1 family protein, putative	1.40E-02	3.1
EHI_091450_at	XM_646308.2	Cysteine protease, putative	9.00E-04	3.0

発現上昇遺伝子リスト

Probe SetID	NCBI RefSeq	Gene name	P-value	Fold-change
EHI_033590_s_at	XM_001913757.1	Leucine rich repeat protein 1	2.20E-04	171.4
EHI_077280_s_at	XM_649953.2	Leucine rich repeat protein, BspA family	1.70E-04	163.1
371.m00031_s_at	XM_643815.1	BspA-like leucine rich repeat protein, putative	3.50E-04	163
628.m00011_at	XM_642822.1	AlG1 family protein*	4.10E-04	8.4
EHI_160330_s_at	XM_001914054.1	Cysteine protease, putative	3.90E-03	7.3
EHI_121160_s_at	XM_001914417.1	Cysteine protease, putative	2.20E-03	7.3
EHI_054690_at	XM_649697.3.2	Metal dependent hydrolase, putative	4.90E-04	5.8
EHI_180390_at	XM_648725.1	AlG1 family protein, putative	2.40E-03	5.0
EHI_174230_s_at	XM_647412.2	S-adenosylmethionine synthetase*	5.40E-03	4.1
EHI_176700_at	XM_001914268.1	AlG1 family protein, putative	1.00E-02	4.1
EHI_179090_at	XM_651187.2	Glycosyltransferase*	9.10E-03	3.6
EHI_176580_at	XM_643164.1	AlG1 family protein, putative	6.90E-04	3.5
EHI_090290_at	XM_645039.1	Competence/ damage-inducible protein, putative	6.80E-04	3.4
EHI_020250_at	XM_643256.1	Leothin:cholesterol acyltransferase protein	7.30E-03	3.3
2.m00624_s_at	XM_652243.1	Protein kinase, putative	3.20E-02	3.3
EHI_006140_at	XM_648345.1	Rho guanine nucleotide exchange factor, putative	3.00E-02	3.2
EHI_028380_s_at	XM_650291.1	Phosphoserine aminotransferase, putative	6.30E-03	3.2
554.m00000_s_at	XM_643035.1	AlG1 family protein, putative	3.00E-03	3.0
EHI_067220_at	XM_647568.1	Rho family GTPase	1.90E-03	3.0
EHI_061780_at	XM_643432.1	Protein folding regulator*	2.00E-02	3.0

発現減少遺伝子リスト

これらの遺伝子群のうち、下記リストに示すものについて定量PCRによる発現変化の確認を行った。この結果、トランスクリプトーム解析で見られた変化は定量PCRでもよく再現することが確認された。

Probe setID	Gene name	Fold change by Microarray	Fold change by qRT-PCR	Regulation
EHI_067770_at	Acetyltransferase, putative	4.9	4.6	Upregulated
EHI_176700_at	AlG1 family protein, putative	4.1	5.1	Downregulat
EHI_128550_at	AlG1 family protein, putative	3.5	5.1	Upregulated
EHI_184190_at	DNA polymerase, putative	12.9	2.5	Upregulated
EHI_006890_at	Hypothetical protein 1	38.0	57.8	Upregulated
EHI_165190_at	Hypothetical protein 2	27.1	18.3	Upregulated
EHI_127670_at	Hypothetical protein 3	17	25.2	Downregulat
EHI_087210_at	Hypothetical protein 4	9.9	22.5	Downregulat
EHI_054690_at	Metal dependent hydrolase, putative	5.8	15.4	Downregulat
EHI_138480_at	Iron-sulfur flavoprotein, putative (ISF1)	6.3	5.8	Upregulated
EHI_025710_at	Iron-sulfur flavoprotein, putative (ISF2)	11.6	15.8	Upregulated
EHI_128980_at	Type A flavoprotein, putative	5.4	3.8	Upregulated
EHI_022600_s_at	Iron-sulfur flavoprotein (ISF4)	5.4	8.1	Upregulated
EHI_075150_at	NAD-specific glutamate dehydrogenase, putative	3.6	16.8	Upregulated
EHI_147020_at	Ser/Thr protein phosphatase family protein	3.3	1.9	Upregulated
EHI_118410_at	Tyrosine kinase, putative	3.1	2.3	Upregulated

定量PCRによる確認

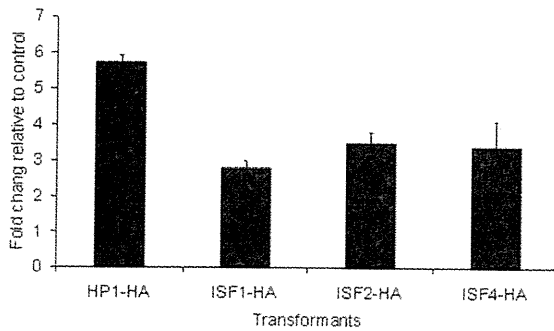
さらに GO term により、発現変化が起きた遺伝子群の特徴を検討した。

GO ID	GO Name	Aspect	Count	p-v
GO:0005525	GTP binding	Function	14	3.95
GO:0005622	intracellular	Component	11	8.89
GO:0005608	proteolysis	Process	10	2.78
GO:0007264	small GTPase mediated signal transduction	Process	8	4.58
GO:0008234	cysteine-type peptidase activity	Function	8	5.09
GO:0016491	oxidoreductase activity	Function	7	2.06
GO:0008152	metabolic process	Process	6	5.52
GO:0004713	protein tyrosine kinase activity	Function	5	5.20
GO:0008508	proteolysis	Process	4	1.34
GO:0009055	electron carrier activity	Function	4	9.26
GO:0015031	protein transport	Process	3	3.99
GO:0003687	DNA-directed DNA polymerase activity	Function	2	2.06
GO:0004222	metalloendopeptidase activity	Function	2	1.54
GO:0005089	Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity	Function	2	4.95
GO:0005686	plasma membrane	Component	2	5.95
GO:0006260	DNA replication	Process	2	2.66
GO:0008520	cellular amino acid metabolic process	Process	2	1.84
GO:0008406	3'-5' exonuclease activity	Function	2	7.91
GO:0010181	FMN binding	Function	2	3.29
GO:0035023	regulation of Rho protein signal transduction	Process	2	4.95
GO:0004648	O-phospho-L-serine:2-oxoglutarate aminotransferase activity	Function	1	5.39
GO:0008554	L-serine biosynthetic process	Process	1	5.39
GO:0006913	nucleocytoplasmic transport	Process	1	5.39
GO:0008483	transaminase activity	Function	1	3.71
GO:0005062	coenzyme binding	Function	1	4.23

GO term enrichment

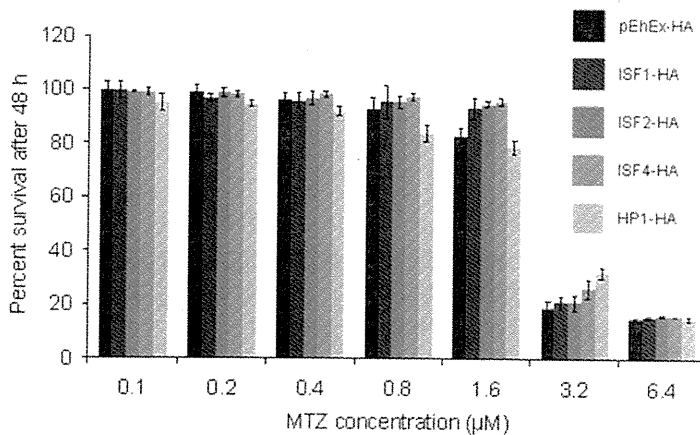
4. MTZ 耐性に関する候補遺伝子強発現株の作成と MTZ 耐性の評価

3. の解析から機能未知ながらも発現変化の大きかった遺伝子 (HP-1)、発現上昇した 35 遺伝子中 7 個と最も多く遺伝子群がリストされた iron-sulfur flavor protein のうち ISF1、2、4 について HA タグを付した融合タンパク質の強発現株の作成と MTZ に対する耐性の変化を評価した。まず外来遺伝子の発現を定量 PCR にて評価した。

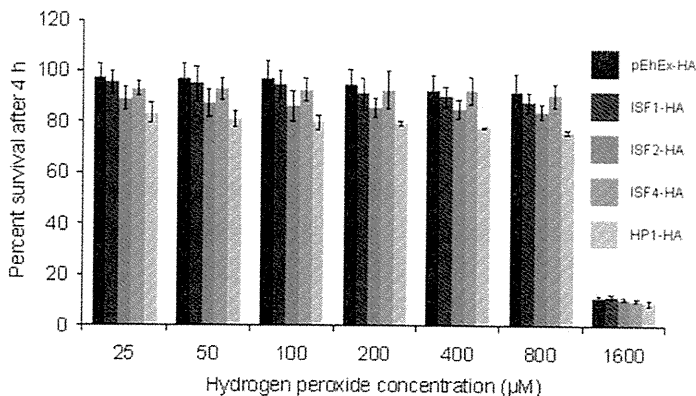


この結果、各強発現株で定常状態 (HM-1 株での発現) に比べ、2 から 6 倍の遺伝子発現上昇が確認された。

これらの株の MTZ への耐性を評価した。



0.8 から 1.6 μM の MTZ に対し ISF1, 2, 4 発現株でやや生存率の上昇がみられた。また 3.2 μM の MTZ に対し、ISF4-HA, HP-1-HA 発現株で弱い耐性となる傾向が見られた。



一方非特異的なストレスである酸化ストレスに対する変化を検討したところ、上のような結果となった。この場合どの濃度の過酸化水素に対してもすべての株が同じような線損率を示しており、非特異的な応答に変化がないことが示唆された。

D. 考察及び結論

本研究では依然作成した 8 μM の MTZ 耐性株よりもより高濃度である 12 μM の MTZ に耐性となった MTZR 株の樹立に成功した。そこで耐性株の特徴とトランスクリプトーム解析を行った。MTZR 株は MTZ の存否によらず同程度の増殖度を示したが、MTZ 非存在下 HM-1 株と比較すると 72.96 時間で増殖の遅れが見られた。一方細胞サイズが上昇し、細胞複製の遅れが示唆された。これは増殖の遅れを反映するものと考えられ、またグルコース代謝の低下もこれに対応した変化と考えられた。また、細胞の複雑さの上昇は細胞内の膜構造の上昇を反映する。これは多くの細胞で創傷や取り込んだ物質の隔離へ向けた対応として知られる変化であり、化学物質への適応時に見られることが知られている。よって MTZ に対し起こった適応反応を反映していると考えられる。どのような応答であるのかは、上昇した膜構造 (細胞内小器官) が何かを明らかにすることで理解が深まると考えられる。

さらに MTZR 株は病原性の低下を示した。これは細胞接着、プロテアーゼ量、貪食能力、CHO 細胞に対する障害活性の低下により示された。一般に薬剤耐性は細胞接着能力の上昇を伴うとされている。しかし *Giardia*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas* 等で、MTZ 耐性と細胞接着の負の相関が示されており、MTZ 耐性には細胞接着の低下が関与すると考えられる。これら病原性と MTZ 耐性の関係は *in vitro* の実験結果であり、生体内での

効果を判定するのは難しい。今後動物実験（ハムスターを用いた肝膿瘍形成試験等）を検討し、この表現型を確認する必要がある。

MTZR 株での他種薬剤への耐性を評価したところ、今回実験を行ったすべての薬剤で耐性の上昇がみられた。imidazole, tinidazole はともに MTZ と同様の骨格を持つ化合物であるため、交差耐性が予想されたが、chloroquine, emetine, paramomycin, hydrogen peroxide への耐性は非特異的な作用と考えられた。よって今回樹立された MTZR 株は非特異的に化学物質に耐性となった株である可能性が示唆された。

トランスクリプトーム解析より、ゲノムデータベースで遺伝子名が決定していた遺伝子から 35 遺伝子の発現上昇と 20 遺伝子の発現抑制が見られた。しかしこの中にこれまで MTZ 耐性の鍵となる遺伝子として知られる PFOR 遺伝子は含まれていなかった。一つはこの MTZR 株が $12 \mu\text{M}$ という他種生物で知られる耐性濃度 $500 \mu\text{M}$ に比べると低濃度の MTZ に対する耐性株であることを反映している可能性がある。しかし以前報告された $40 \mu\text{M}$ MTZ 耐性株の赤痢アメーバの解析でも PFOR の変化起きていない。もしくは赤痢アメーバは pyruvate dehydrogenase や pyruvate decarboxylase を持たないため PFOR が必須でないことが考えられる。そして *Giardia* や *Trichomonas* とは別のユニークな耐性メカニズムの存在を示唆している。また、以前の研究から Fe-SOD の発現上昇と ferredoxin (Fdx) の発現抑制が報告されているが、これらの遺伝子についても変化が見られなかった。Fe-SOD の mRNA レベルと酵素活性については必ずしも一致しないことが他種生物で報告されている。よって本 MTZR 株でも活性を測定し評価しなおす必要がある。また Fdx の遺伝発現抑制株が完全な MTZ 耐性株にならない例や SOD 活性

の上昇が MTZ 耐性と関連しない例も細菌で知られている。発現上昇遺伝子では ISF タンパク質が 7 つリストされ、赤痢アメーバにおける MTZ 耐性機構に重要と考えられた。ISF は酸化還元活性のあるタンパク質で嫌気性原核生物に見られる。真核生物では赤痢アメーバと *T. vaginalis* でのみアノテーションされている。ISF1, 2 は HM-1 株を MTZ 存在下培養した場合でも 20 倍程度発現上昇すること、システイン除去培地で培養した場合や参加ストレス状態、マウスの腸管への接種モデルでも発現上昇がみられていることから、環境ストレスへの応答に寄与する遺伝子と考えられる。

トランスクリプトーム解析から MTZ 耐性に重要と考えられる 4 遺伝子を選び強発現株を作成し、表現型特に MTZ への耐性を評価した。発現上昇は確認されたものの、MTZ 耐性の変化はほとんど見られなかった。これらの結果から、赤痢アメーバにおいて MTZ 耐性に重要な遺伝子は単一でなく、複数の遺伝子産物の協調的な作用が重要であることが示唆された。

今回作成した MTZR 株の解析から耐性株がストレスに耐性となるような変化を起こしていること、単一の遺伝子ではなく協調的な作用で耐性を獲得していることが明らかとなった。今回の MTZR 株は MTZ 非存在下で培養することで耐性を失ってしまった事実、これまで知られていた PFOR, Fe-SOD, Fdx 遺伝子の変化がないことから、赤痢アメーバの MTZ 耐性機構は MTZ の活性化を抑制するのではなく、MTZ の毒性に順応し、適応するような応答をしていることが明らかになった。このような応答は赤痢アメーバにユニークであることから、引き続き解析を行う必要がある。特に MTZ 活性化を抑制する酵素群については酵素活性の測定を行い、変化の有無を明らかにする必要がある。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

Penuliar, G. M., Furukawa, A.,
Nakada-Tsukui, K., Husain, A.,
Sato, D., Nozaki, T. (2012)
Transcriptional and functional
analysis of trifluoromethionine
resistance in *Entamoeba*
histolytica. J Antimicrob
Chemother. 67: 375-86.

2. 学会発表

Penuliar G. M., Nakada-Tsukui, K.,
Nozaki, T., Phenotypic and
transcriptional profiling in
Entamoeba histolytica reveal
costs to fitness and adaptive
responses associated with
metronidazole resistance.
Amoebiasis 2012, Khajuraho,
India, 2012. 3. 2~7

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

研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

トキソプラズマ感染における宿主機能ハイジャック機序の解明

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

トキソプラズマと宿主細胞表面との相互作用には、原虫が宿主表面へ付着した後にロプトリー蛋白質が小胞 (evacuole) として宿主内へ注入されるステップと、また原虫自身の侵入の際に原虫を囲む parasitophorous vacuole (PV) が形成されるステップの2つが考えられる。GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカーを付加した GFP を発現する CHO 細胞を用い、evacuole と PV への GPI の取込みを観察すると、GPI はそれらの両方に取り込まれた。一方で GPI が存在しているラフトの構成蛋白質の1つである caveolin-1 は、evacuole にも PV にも取り込まれなかった。このことから、先行研究で報告されている PV 形成時の選択的取り込みが、evacuole 形成時においても行われている可能性が示唆された。また、methyl- β -cyclodextrin (MBCD) によりラフト構造を破壊した状態で同様の解析を行ったところ、PV に GPI は取り込まれたが evacuole には取り込まれなかった。この結果から正常な evacuole の形成には正常なラフト構造の存在が必須であることが示唆された。また複数のロプトリー蛋白質の局在を指標に、evacuole の形成を GPI アンカー生合成能欠失変異 CHO 細胞と野生株間で比較すると、変異株で明らかに evacuole の形成が過剰になっていた。さらに、それらのロプトリー蛋白質は過剰形成された evacuole 内で、共局在していた。一方、宿主 GPI の有無は、PV 形成 (原虫の侵入) には影響を与えなかった。原虫増殖の際、PV 膜に宿主のミトコンドリアや ER がリクルートされることが知られている。そこで原虫感染の際のこれらのオルガネラのリクルート能を GPI 生合成変異株と野生株間で比較すると、変異株内で両オルガネラのリクルートが増加していた。また、両細胞間での原虫の増殖は、感染後期のみ差が認められた。これらのことから、変異株では、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と ER のリクルートが増加した結果、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

GFPにGPIアンカー付加シグナルを付与したCHO細胞(GFP-GPI-CHO)を用いてPVおよびevacuoleの形成を観察した。また、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およびER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)

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、GFP-GPI-CHO細胞を用い、evacuoleとPVへのGPIの取込みを観察すると、GPIはそれらの両方に取り込まれた。一方でGPIが存在しているラフトの構成蛋白質の1つであるcaveolin-1は、evacuoleにもPVにも取り込まれなかった。また細胞をMBCD処理しラフト構造を破壊した状態で同様の解析を行ったところ、PVにGPIは取り込まれたがevacuoleには取り込まれなかった。この結果から正常なevacuoleの形成には正常なラフト構造の存在が必須であることが示唆された。そこでROP1、2および16を指標にevacuole形成能を野生株とGPI欠失変異株で比較したところ、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。一方で、宿主GPIの有無は、PV形成(原虫の侵入)には影響を与えなかった。

原虫が宿主細胞内で増殖する際、PV膜に宿主のミトコンドリアやERがリクルートされることが知られており、またそれらのリクルートにはロプトリー蛋白質の関与が考えられている。そこで原虫の宿主細胞ミトコンドリアのリクルート能をMitoTrackerあるいは抗COX IV抗体により、またERのリクルート能を抗KDEL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。

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増大していた。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。

D. 考察

以上の結果から、宿主GPIはトキソプラズマ感染におけるevacuole形成に重要な役割を果たしており、GPI欠失変異細胞は正常なevacuole形成が阻害されることが示唆された。一方で変異株内ではミトコンドリアやERのPV近傍へのリクルートが増加していた。この原因の一つの可能性として、ロプトリータンパク質の宿主細胞への過剰注入が考えられた。また、原虫の宿主細胞内での増殖は、これらのオルガネラがリクルートされる感染成立後24時間以降に更新していた。以上の結果から、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やER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られた。

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、ミトコンドリアやER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) Yamamoto, M., Ma, J.S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Megumi, Okuyama, M., Kayama, H., Nagamune, K., Takashima, S., Matsuura, Y., Soldati-Favre, D., and Takeda, K. "ATP6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma* virulence factor ROP18." *J. Exp. Med.* 2011, 208, 1533-46

(2) Nakatani, F., Morita, Y.S., Ashida, H., Nagamune, K., Maeda, Y., and Kinoshita, T. "Identification of a second catalytically active trans-sialidase in *Trypanosoma brucei*." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2011, 415, 421-5

(3) Toyama, T., Tahara, M., Nagamune,

K., Arimitsu, K., Hamashima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K. "Gibberellin Biosynthetic Inhibitors Make Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Cells Swell and Rupture to Death." *PLoS ONE in press*

(4) 早川昌志、西村文秀、加藤将、末友靖隆、松山幸彦、金澤篤志、一宮睦雄、桑田晃、山田和正、永宗喜三郎、福士路花、海老根一生、吉見英明 「藻類の仲間たち」 原生動物園 2011, 2: 25-41

(5) 泉山信司、八木田健司、永宗喜三郎 「生水と原虫症（生水のリスク）」 公衆衛生 2012, 76: 50-53

2. 学会発表

(1) 招待講演

永宗喜三郎 “アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモン様物質とその作用” 日本生物科学研究所 第二研究会 2011年6月、東京

(2) Fkshi, M., Aonuma, H., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., and Nagamune, K. “Analyzing of the mechanism of action of primaquine on *Toxoplasma gondii*.” 11th International Congress on Toxoplasmosis, Ottawa, Canada, June 2011

(3) 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*.” 11th International Congress on Toxoplasmosis, Ottawa, Canada, June 2011

(4) BEST Presentation Awardノミネート

Syed Bilal Ahmad Andrabi、田原美智留、青沼宏佳、遠山知子、田邊和裕、野崎智義、永宗喜三郎 “Plant hormone cytokinins: Elucidating their role in *Toxoplasma gondii*.” 第80回日本寄生虫学会大会・第22回日本臨床寄生虫学会大会合同大会 2011年7月、東京

(5) 田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “宿主GPIアンカーがトキソプラズマ感染に及ぼす影響” 第80回日本寄生虫学会大会・第22回日本臨床寄生虫学会大会合同大会 2011年7月、東京

(6) 福士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 “トキソプラズマにおけるプリマキンの作用機序の解明” 第80回日本寄生虫学会大会・第22回日本臨床寄生虫学会大会合同大会 2011年7月、東京

(7) Symposium

Nagamune, K. and Andrabi, S.B.A. “Plant hormone cytokinins: Elucidating the role in *Toxoplasma gondii*.” International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 2011, Sapporo

(8) Fkshi, M., Aonuma, H., Tahara, M., Andrabi, S.B.A., and Nagamune, K. “Analyzing of the mechanism of action of primaquine on *Toxoplasma gondii*.” International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 2011, Sapporo

(9) Keynote Lecture

Nagamune, K. “Apicomplexan parasites and plant hormones.” The 3rd International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, September 2011, Sapporo

(10) 福士路花、青沼宏佳、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 “細胞外トキソプラズマに見られる新規オルガネラについて” 第19回分子寄生虫学ワークショップ 2011年10月、神戸

(11) 永宗喜三郎 “トキソプラズマと自由生活性二次植物のプラスチド輸送シグナルについて” 第19回分子寄生虫学ワークショップ 2011年10月、神戸

(12) シンポジウム

永宗喜三郎 “新しい抗マラリア薬への期待：トキソプラズマをモデルとした発信” 第52回日本熱帯医学会大会・第26回日本国際保健医療学会学術大会合同大会 2011年11月、東京

(13) ワークショップ

福士路花、田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、永宗喜三郎 “細胞外トキソプラズマにおける未知の酸性オルガネラについて” 第44回日本原生動物学会大会 若手の会ワークショップ 2011年11月、奈良

(14) シンポジウム

Nagamune, K. and Andrabi, S. B. A.
“*Toxoplasma gondii* and plant hormone-
s.” 第34回日本分子生物学会 2011年12月、
横浜

(15) フォーラム
永宗喜三郎 “マトリョーシカ型進化原理”
第34回日本分子生物学会
2011年12月、横浜

H. 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 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
「顧みられない寄生虫病の効果的監視法の確立と感染機構の解明に関する研究」

平成 23 年度分担報告書

研究課題「原虫類への新規遺伝学的手法の開発」

研究分担者 平井 誠 群馬大学 大学院医学研究科 国際寄生虫病 講師

研究要旨：ネズミマラリア原虫をモデルとして新規遺伝学的手法を開発する。この技術を他の原虫感染症病原体へ移転し、顧みられない原虫感染症制圧に向けた基盤的研究を強化する。

A. 研究目的

原虫感染症制圧に向けた基盤的研究は、その研究手法が未成熟であることが原因し他の感染症と比較して大きく立ち遅れている。このことは顧みられない原虫感染症においては言うまでもない。本研究課題は、ネズミマラリア原虫をモデル生物として順遺伝学的ツールを開発する。具体的には、高頻度に突然変異が発生するネズミマラリア原虫 (PbMutator) を作成する。この技術を本研究班において赤痢アメーバ等の他の原虫類へ技術移転する。これにより顧みられない原虫感染症制圧に向けた基盤的研究を強化することが本研究課題の目的である。

B. 研究方法

1) ネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) DNA 複製酵素 δ -DNA polymerase (PolyDel) 遺伝子をクローニングする。2) PolyDel のエラー校正活性に関与するアミノ酸 2 か所を Ala に置換した (D311A, E313A) 組換えプラスミド DNA を作成

する。3) 組換えプラスミドで内在性 δ -DNA polymerase 遺伝子を入れ換えた原虫を作成する (PbMutator 原虫)。4) PbMutator をマウスに継代感染する。具体的には、一週間に一回の頻度で感染赤血球 1 万個を正常マウスへ継代感染する。第 122 週目において PbMutator を限界希釈法によりクローン化する。第 122 週 PbMutator 原虫クローンにおいて、本来ならば修正されるべき遺伝子変異が校正機能低下によりゲノムに蓄積することを確認する。これにより PbMutator 原虫が Mutator として機能することを証明する。

(倫理面への配慮)

本研究課題は群馬大学動物実験安全委員会および組換えDNA実験安全委員会の承認を受けており、法令に基づいて研究を行っている。

C. 研究結果

研究は順調に進行し目的とする PbMutator 原虫を作成することに成功した。PbMutator 原虫をマウスへ継代感染し、第 1 2 2 世代原虫から 2 つの原

虫クローンを得た。イルミナ社製次世代シーケンサーHiSeq2000を用いてPbMutator原虫2クローン、およびコントロール原虫クローンの全ゲノムをシーケンシングし変異解析を行った。その結果、野生型原虫では2個の変異が、PbMutator原虫クローンではそれぞれ173、174個の変異が検出された。以上のことからPbMutator原虫は継代によりゲノム内に変異が蓄積されていることが明らかとなり、いわゆるミュータントライブラリーが構築できたと考えられる。

D. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

E. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

2. 学会発表

①Hirai M. Male fertility of malaria parasite is determined by GCS1, a plant-type reproduction factor. Malaria Mini-symposium (2011年9月6日。於：長崎大学熱帯医学研究所)

②Hirai M. Male fertility of malaria parasite is determined by GCS1, a plant-type reproduction factor. Biology of Malaria. IUMS 2011 (2011年9月8日。於：北海道札幌市)

③平井 誠「GCS1を基軸としたマラリア原虫配偶子認識・膜融合機構の解明」
第75回日本植物学会シンポジウム (2011年9月18日。於：東大駒場キャンパス)

④平井 誠「超加速変異(進化)型ネズミマラリア原虫の創出とその順遺伝学への応用」

第81回日本寄生虫学会大会 (2012年3月24日。於：兵庫医科大学)

F. 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

蠕虫性幼虫移行症の病態の解明

分担研究者 丸山治彦 宮崎大学医学部 教授

研究要旨 宮崎大学医学部寄生虫学で施行した血清診断では、2011年においても肺吸虫症と回虫類の幼虫による幼虫移行症が多数を占めた。幼虫移行症の原因虫種の確定は予防などの対策のために必須の情報なので、組換えブタ回虫抗原の As16 と組換えトキソカラ抗原 TcAg によってブタ回虫感染とイヌ回虫感染を鑑別できるのか、ブタ回虫感染動物が産生する抗体が As16 特異的エピトープを認識するのかを検討した。その結果、ブタ回虫に感染したブタが産生する抗 As16 抗体は As16 特異的でありイヌ回虫抗原には結合せず、両者の組み合わせによる鑑別診断はおそらく可能であることが明らかとなった。また、ブタを用いた感染実験により、イヌ回虫とネコ回虫（どちらもトキソカラ属）では、感染後の体内移行経路が大きく違っていることが示唆された。

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を構築し、多くの寄生虫病の診断に関わってきた。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（表 1 は過去 6 年間の集計）。

表 1 宮崎大学医学部寄生虫学における寄生虫症診断実績

原因寄生虫	2006	2007	2008	2009	2010	2011
イヌ回虫/ブタ回虫	82	101	78	49	48	48
アニサキス	4	6	3	2	2	3
顎口虫	0	6	7	9	3	4
鉤虫	0	1	0	1	1	1
マンソン孤虫	3	6	4	5	2	4
肺吸虫	37	46	38	38	45	35
肝蛭	2	3	1	1	3	2
住血吸虫	6	6	4	4	3	6
肝吸虫	0	0	0	0	1	3
糞線虫	1	1	2	0	2	0
広節/日本海裂頭条虫	2	0	1	0	4	2

これらの抗体検査は、ほとんどの場合虫体の粗抗原を用いておこなわれているが、大きな問題点がふたつある。第 1 は、多くの寄生虫が実験室内での維持ができないので、抗原の入手には常に困難がともなうことである。第 2 に、いくつかの疾患において抗原間の交叉反応が強く、

単純な結合試験では真の原因虫種を明らかにできないことである。とくに動物由来の回虫類による幼虫移行症では、イヌ回虫とブタ回虫では感染経路や疫学に違いがあることが予想されるにも関わらず、現時点では両者を鑑別することは容易ではない。

そこで、幼虫移行症の診断にまつわるこれらの問題点を解決するために、イヌ回虫とブタ回虫の組換え抗原を用いた診断/鑑別システムを開発する。これまでの研究において、組換えブタ回虫抗原 rAs16 と組換えイヌ回虫抗原 r*T.canis*Ag (TES32) の組み合わせがもっとも有望であることがわかっているので、患者血清で虫種鑑別をおこなうとともに、感染実験により虫種が分かっている感染ブタ血清をもちいて、rAs16 がブタ回虫に特異的なエピトープを含むのかを検討する。

また、幼虫移行症の病態を解明するための基礎的な研究として、ブタ回虫を非固有宿主のモルモットに感染させ、感染動態を調べた。さらに、同じトキソカラ属の寄生虫であるイヌ回虫とネコ回虫をブタに感染させ、ブタ体内での幼虫の動態、分布等を調べた。それはイヌ回虫とネコ回虫は抗体で識別するのが困難であり、感染経路や病態などに違いがありながら、現在は両者が混同されている可能性が高いからである。