

することにより、トキソプラズマ原虫が宿主に及ぼす影響に関する解析を行うこともできる (Jia *et al.*, 2013)。更に、ルシフェラーゼを発現させた組換え原虫を用いることにより、マウス体内におけるトキソプラズマ原虫の動態をマウスが生きた状態で経時的に観察することも可能である (Saeji *et al.*, 2005)。

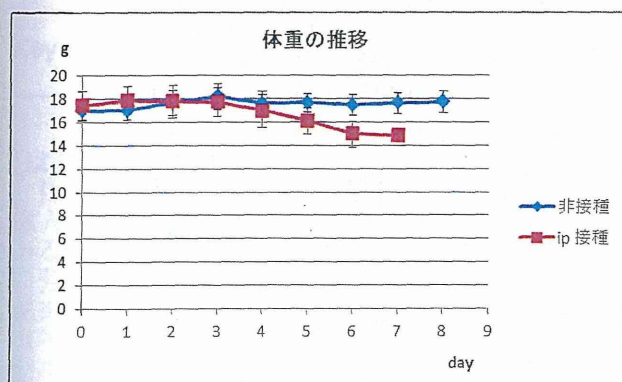
[謝辞]

本研究は、科学研究費補助金・若手研究、挑戦的萌芽研究、新学術領域研究、テニユアトラック普及・定着事業、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業により行われた。

[文献]

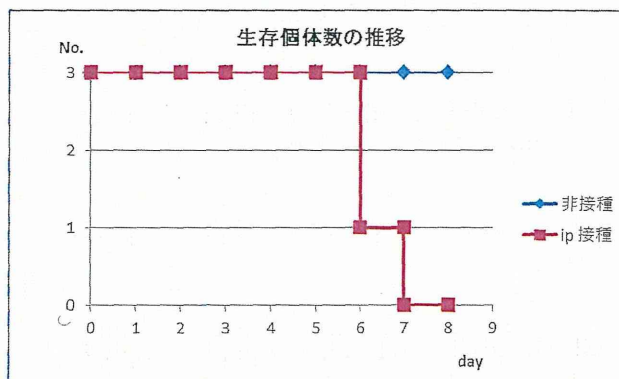
- 1) 吉田幸雄：人畜共通感染症のまとめ．図説人体寄生虫学 改訂第6版，南山堂 東京 2002, 262-263
- 2) 大西健児：話題の感染症 人獣共通寄生虫症．モダンメディア, 54:193-201, 2008
- 3) Roos DS, Donald RGK, Morrisette NS *et al.*: Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. Microbes as tools for cell biology (Methods in cell biology, Vol.45), Academic Press Inc., Maryland, 1994, 27-63
- 4) Saeji JPJ, Boyle JP and Boothroyd JC: TRENDS in Parasitology, Differences among the tree major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. 21:476-481, 2005
- 5) Howe DK, Summer BC and Sibley LD: Acute virulence in mice is associated with markers on chromosome VIII in *Toxoplasma gondii*. Infection and Immunity, 64:5193-5198, 1996
- 6) Sugi T, Kato K, Kobayashi K *et al.*: 1NM-PP1 treatment of mice infected with *Toxoplasma gondii*. J Vet Med Sci, 73:1377-1379

[図 1]



BALB/c マウスに *T. gondii* RH タキゾイトを 10^3 /head 腹腔内接種後、体重の推移を記録した (筆者らによる予備実験結果より)。

[図 2]



BALB/c マウスに *T. gondii* RH タキゾイトを 10^3 /head 腹腔内接種後、生存個体数の推移を記録した (筆者らによる予備実験結果より)。

トキソプラズマ原虫膜抗原の糖鎖結合性の解析法

竹前 等¹⁾, 小林郷介²⁾, 加藤健太郎¹⁾

1) 帯広畜産大学原虫病研究センター 2) 東京大学医科学研究所

1) 〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地 2) 〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1

[抄録] トキソプラズマ原虫の効率的な宿主細胞侵入には宿主細胞表面の糖鎖構造の認識が重要である。ここでは、CHO グリコシル化変異体を用いたトキソプラズマ原虫膜抗原の糖鎖結合性の解析法について紹介する。

キーワード; トキソプラズマ原虫、膜抗原、組換えタンパク質、CHO グリコシル化変異体、フローサイトメトリー

Method for carbohydrate binding of *Toxoplasma gondii* membrane antigens

Hitoshi Takemae¹⁾, Kyousuke Kobayashi²⁾, Kentaro Kato¹⁾

1) National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine 2) Institute of Medical Science, The University of Tokyo

1) Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan 2) 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

Abstract: Recognition of carbohydrate structures on the host cell surface is critical for efficient invasion by *Toxoplasma gondii*. In this report, we introduce the analysis method for carbohydrate binding of *T. gondii* membrane antigens using CHO glycosylation mutants.

Key Words: CHO glycosylation mutant, flow cytometry, membrane antigen, recombinant protein, *Toxoplasma gondii*,

[はじめに]

トキソプラズマ原虫タキゾイトの侵入過程には、マイクロネーム・ロプトリーなどの先端部小器官から分泌される多くのタンパク質が関与している。これらのタンパク質のうちのいくつかはアドヘシンとして働き、宿主細胞レセプターに結合する。マイクロネームタンパク質 TgMIC1-4-6 複合体の構成因子である TgMIC1、TgMIC4 については、結合糖鎖構造の解析が詳細になされているが、そのほかのトキソプラズマ原虫膜抗原の糖鎖結合性の解析は十分でない。ここでは、CHO グリコシル化変異体とトキソプラズマ原虫膜抗原組換えタンパク質を用いた結合実験の方法について紹介する。

[方法]

[A] 細胞

CHO-K1 野生型及び CHO 変異体細胞は ATCC (American Type Culture Collection) から入手可能である。CHO 変異体細胞は以下のものを実験に使用した。

pgsA-745: ヘパラン硫酸・コンドロイチン硫酸欠損株

pgsD-677: ヘパラン硫酸欠損株

Lec2: シアル酸欠損株

ld1d: O-グリコシル化欠損株

[B] 方法

組換えタンパク質の調製は、我々のグループでこれまで良好な成績を得ている昆虫細胞発現系を一例として紹介する。

(1) 原虫膜抗原遺伝子のクローニング

原虫膜抗原遺伝子の推定上のシグナルペプチド配列及び膜貫通領域を除いた部分について、原虫 cDNA を鋳型とし、KOD FX Neo (ToYoBo 社)を用いた PCR によって増幅する。増幅産物を昆虫細胞発現用トランスファーベクター pBSV-Fc-8His (Kobayashi *et al.*, 2010) に挿入する。

pBSV-Fc-8His ベクターは、ポリヘドリンプロモーターの下流にヒト FHL-1 タンパク質由来の分泌シグナル配列とマウス IgG2a 由来の Fc 配列を有しており、目的遺伝子産物は Fc 融合タンパク質として培養上清に分泌される。

(2) 組換えバキュロウイルスの調製

i) 1×10^6 個の Sf9 昆虫細胞を 6 ウェルプレートに播種する。

ii) 27°C インキュベーター中で 1 時間静置し、細胞を定着させる。

- iii) 4 μ l の滅菌蒸留水に 8 μ l の Cellfectin II Reagent (Life Technologies 社) をゆっくり加え、室温で 10 分間インキュベートする (溶液 A)。
 - iv) 0.5 μ l の BaculoGold DNA (0.1 μ g/ μ l: BD Biosciences 社)、3 μ g のトランスファーベクタープラスミドに滅菌蒸留水を加えた 12 μ l の溶液を調製する (溶液 B)。
 - v) 溶液 A と溶液 B を穏やかに混和し、室温で 15~30 分間インキュベートする。
 - vi) (v) のインキュベート中に (ii) の Sf9 細胞を血清を含まない Sf-900II SFM 培地 (Life Technologies 社) で 2 回洗浄する。
 - vii) Sf9 細胞に Sf-900II SFM 培地を 800 μ l 加えたのち、DNA-Cellfectin 溶液を添加する。
 - viii) ゆっくり振盪しながら 27°C で 2 時間インキュベートする。
 - ix) 10% FCS を含む Sf-900II SFM 培地を 2 ml 加え、27°C インキュベーター中で 3~4 日間培養する。
 - x) 上清をバキュロウイルスストックとして回収し、-80°C で保存する。
 - xi) 上清の一部を Sf9 細胞に接種し、ウイルスの増幅を行う。
- (3) Fc 融合組換えタンパク質の発現・精製
- 組換えタンパク質の発現には無血清培地で培養したタンパク質高発現細胞株 Tn5 を用いる。6 ウェルプレートのスケールでウイルス量、感染時間の検定を行ったのち、以下の発現、精製を行う。
- i) T300 フラスコに 3.2×10^7 個の Tn5 細胞を播種する。
 - ii) 組換えバキュロウイルスを感染させ、27°C で 72~96 時間インキュベートする。
 - iii) 培養上清を回収し、0.45 μ m フィルターで濾過する。
 - iv) 濾過した培養上清に Ni-NTA agarose (QIAGEN 社) を加え、ローテーターで穏やかに転倒攪拌しながら、4°C で 1 時間インキュベートする。
 - v) 遠心後、上清を取り除く。
 - vi) Ni-NTA agarose にイミダゾールを含む溶出バッファー (20~350 mM imidazole, 50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl) を段階的に添加し、目的の Fc 融合組換えタンパク質を含むフラクションを回収する。
 - vii) Spin-X UF6 (Corning 社) を用いて PBS へのバッファー交換、濃縮を行う。
 - viii) 少量ずつ分注し、-80°C で保存する。
- (4) Fc 融合組換えタンパク質の結合試験
- i) T25 フラスコで培養した CHO 細胞を PBS で一回洗浄後、0.02% EDTA-4Na を含む PBS を加え、37°C/5% CO₂ インキュベーター中で大部分の細胞がはがれるまで静置する。
 - ii) 細胞を回収後カウントし、10⁵ 個の細胞を 1.5 ml チューブに移し、5,000 rpm で 2 分間遠心する。
 - iii) FACS バッファー (2% FCS, 0.01% NaN₃ in PBS) 200 μ l で 1 回洗浄する。
 - iv) 細胞ペレットに Fc 融合組換えタンパク質を含む FACS バッファーを 100 μ l 加え、数回ボルテックスする。

- v) ローテーターで穏やかに転倒攪拌しながら、4°C で 1 時間インキュベートする。
- vi) FACS バッファー 200 μ l で 2 回洗浄する。
- vii) 細胞ペレットに FACS バッファーで 1,000 倍に希釈した FITC 標識抗マウス IgG (Cappel 社 #55499) 溶液 100 μ l を加える。
- viii) ボルテックスし、氷上で 20 分間インキュベートする。インキュベート中に一度ボルテックスする。
- ix) FACS バッファー 200 μ l で 3 回洗浄する。
- x) 細胞ペレットを 350 μ l の FACS バッファーで懸濁し、FACS 解析用のチューブに移す。
- xi) 10⁴ 個の生細胞について、FACSCalibur (BD Biosciences 社) と WinMDI 2.9 ソフトウェア (Scripps Research Institute ウェブサイトから利用可能) を用い、Fc 融合組換えタンパク質の結合を評価する。

[結果]

昆虫細胞発現により、トキソプラズマ原虫 MIC1 (TgMIC1) 及びタンパク質 X を Fc 融合タンパク質として発現・精製した (図 1)。Ni-NTA agarose 精製後のサンプルにおいて、目的タンパク質 (図 1、矢じり) 以外の分子量約 65,000 のタンパク質が存在するが、このタンパク質は抗マウス IgG 抗体と反応しないため、以降の結合実験に影響しない。



図 1: Fc 融合組換えタンパク質の精製

Fc 融合組換えタンパク質と CHO-K1 野生型及び CHO グリコシル化変異体との結合実験の成績を図 2 に示す。Fc-8His 組換えタンパク質を陰性コントロール (黒線) とし、各 Fc 融合組換えタンパク質の結合 (灰色) を解析した。シアル酸含有糖鎖との結合が報告されている TgMIC1 は、CHO-K1 細胞と結合するが、この結合はシアル酸欠損株である Lec2 において完全に消失する (図 2A)。

タンパク質 X は CHO-K1 細胞に結合するのに対し、ヘパラン硫酸・コンドロイチン硫酸欠損株である pgsA-745 には結合性を示さない。この結合性の消失はヘパラン硫酸欠損株である pgsD-677 において同様に観察される (図 2B)。一方、Lec2 株では CHO-K1 細胞と比較

してわずかに結合が減少し、*O*-グリコシル化欠損株である *ldlD* では結合は全く変化しなかった。これらの結果から、タンパク質 X は主に細胞表面のヘパラン硫酸鎖に結合することが判明した。

Akashi, H., and Kato, K. (2012) A novel PAN/apple domain-containing protein from *Toxoplasma gondii*: characterization and receptor identification. PLoS One 7: e30169

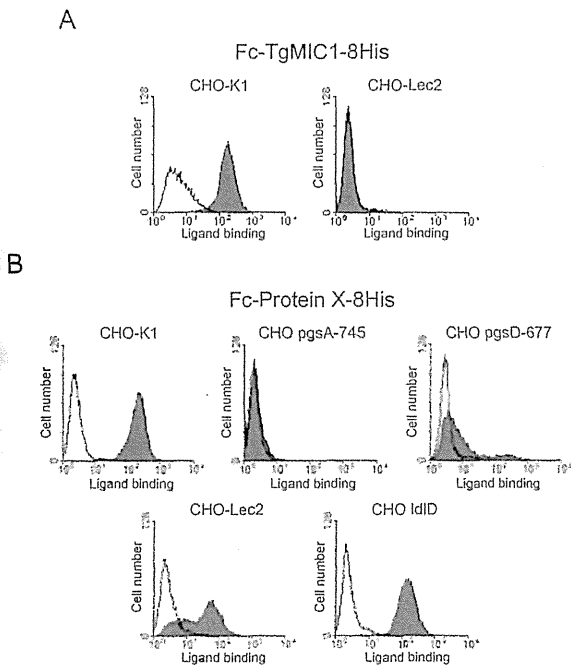


図 2: CHO 変異体細胞と Fc 融合組換えタンパク質を用いた FACS 解析

[考察]

本法の利点は以下の 3 点である。

- (1) 細胞膜分画の調製、可溶化等を行うことなく、比較的短時間で結合実験が完了する。
- (2) CHO 細胞と変異体を用いた結合試験のみならず、様々な培養細胞及び酵素処理後の細胞との結合を調べることが可能である (Gong *et al.*, 2012)。
- (3) 大腸菌発現の GST 融合タンパク質と FITC 標識抗 GST 抗体を用いて同様の解析を行うことが可能である。なお、本法において、市販の FITC 標識 His タグ抗体では良好な成績が得られなかった。

[謝辞]

本研究は、科学研究費補助金・若手研究、挑戦的萌芽研究、新学術領域研究、テニュアトラック普及・定着事業、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業により行われた。

[文献]

- 1) Kobayashi, K., Kato, K., Sugi, T., Takemae, H., Pandey, K., Gong, H., Tohya, Y., and Akashi, H. (2010) *Plasmodium falciparum* BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. J. Biol. Chem. 285: 1716-1725
- 2) Gong, H., Kobayashi, K., Sugi, T., Takemae, H., Kurokawa, H., Horimoto, T.,

赤内期における熱帯熱マラリア原虫の培養法

田坂修也¹⁾, 加藤健太郎^{1),2)}

1) 東京大学 農学部 獣医微生物学研究室

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

2) 帯広畜産大学 原虫病研究センター 地球規模感染症学分野

〒080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 13 番地

[抄録] 熱帯熱マラリア原虫は、熱帯や亜熱帯地方で見られ、特にマラリア感染者の血液内で無性生殖をおこなうことで増殖し、重篤な障害をもたらす。この赤内期における熱帯熱マラリア原虫の生活環は *in vitro* でも再現でき、マラリア原虫の性状を明らかにするために必須である。本稿では、マラリア原虫培養の基本的な方法を述べる。

キーワード ; 熱帯熱マラリア原虫、赤内期、培養

Culture of *Plasmodium falciparum* in intraerythrocytic stage

Shuya Tasaka¹⁾, Kentaro Kato^{1),2)}

1) Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo 1-1-1 Yayoi,

Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

2) Department of Reserch Unit for Global Infection Control, National Research Center for Protozoan Diseases,

Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada, Obihiro, Hokaido, 080-8555, Japan

Abstract : Malaria is an infectious disease, especially seen in tropical and subtropical regions. Malaria parasites, *Plasmodium* spp, increase by asexual reproduction in erythrocytes of patients, and induce severe disease. The replication of intraerythrocytic stage of *Plasmodium falciparum* can be reproduced *in vitro*, and is necessary for identifying the characterization of malaria. In this article we described a standard method for culture of *P. falciparum*.

Key Words; culture, intraerythrocytic stage, *Plasmodium falciparum*,

はじめに

マラリアは、アフリカや東南アジアなどの熱帯や亜熱帯地域で多くみられるヒトの感染症である。これは、ハマダラカによって、アピコンプレクサに属するマラリア原虫が媒介されることで感染が起きる。WHO の報告によれば、2010 年度におけるマラリアの感染者は 2 億 1900 万人であり、死者は 66 万人と、多くの人を苦しめている疾病である。マラリア原虫は、ハマダラカの吸血に伴いヒトの血液中に入ると、いったん肝臓内で増殖した後、メロゾイトが血流中へと放出されて赤血球内へと侵入し、その中でリング型→トロフォゾイト→シズントへと発育していく。シズント感染赤血球からのメロゾイト放出を繰り返すことで感染者の血液内で増殖する。

この赤内期におけるマラリア原虫の無性生殖は *in vitro* でも再現でき、多くの研究者の研究対象とされている。マラリア原虫の培養法は 1976 年に Trager と Jensen が連続培養に成功して以来、様々な改良法が加えられて現在に至

っている(脇, 2010, Azar Radfar *et al.*, 2009)。赤内期におけるマラリア原虫の培養はこの段階におけるマラリア原虫の研究のために必須である。本稿では、赤内期におけるマラリア原虫の基本的な培養方法について述べる。

[方法]

(1) 準備

1. CM(complete medium)の作成

○ICM(incomplete medium) for 5L の作成

・ RPMI1640(sigma) 5L 相当

・ 1M HEPES 125mL

・ 0.1M hypoxanthine 5mL

・ 50mg/mL gentamycin 1250μL

上記の物質を 5L の DW に溶かして滅菌されたビンに 0.45μm のフィルターでろ過滅菌して 500mL ずつ分注していく。(10 本分)

○CM(complete medium) for 500mL の作成

・ ALBUMAX I 2.5g

・ 7.5% NaHCO₃ 10mL

上記の物質を ICM(500mL)へと溶かす。CM は

4℃で保存し、2週間以内に使い切るのがよい。
使用直前には 37℃に温めておく。

2.血液の調整

採取した血液に ACD などの血液抗凝固剤 (heparin はメロゾイトの RBC 侵入阻害効果があるので適さない(Boyle *et al.*, 2010))を加え、遠心(3,000rpm, 20 分, 4℃)する。上清とバッフィーコートを取り除き、4℃の CM で 2 回洗浄する。

赤血球体積と同量の CM を加えて軽く転倒混和する。4℃で保存し、溶血があるため摂取後 2 週間までに使用するのが望ましい。

3.凍結原虫解凍に必要な溶液の調整

- ・ 12% NaCl in DW
- ・ 1.6% NaCl in DW
- ・ 0.2% Dextrose/0.9% NaCl in DW

それぞれ、0.45μL のフィルターでろ過滅菌して、4℃で保存する。使用直前には 37℃に温めておく。

4.凍結保存液の作成

- ・ グリセリン 35g
- ・ D-sorbitol 3.0g
- ・ NaCl 0.65g

上記の物質を DW に溶解し、全量を 100mL とする。0.45μm のフィルターでろ過滅菌して 4℃で保存する。使用直前には 37℃に温めておく。

(2) 手順

1.凍結原虫の解凍

凍結保存原虫を以下の手順で解凍していく。

- i. ウォーターバス内で解凍し、解凍した全量 (1.0mL とする)を 15mL チューブへ移す。
- ii. 0.2 倍量(0.2mL)の 12% NaCl in DW を優しく振りながら点滴して加える。
→3 分間静置する。
- iii. 10 倍量(10mL)の 1.6% NaCl in DW を加える。初めの 1mL は液面のそばから点滴して慎重に加えていく。
→軽く転倒混和
→遠心(2,000rpm, 5 分, RT)し、上清を除去する。
- iv. 10 倍量(10mL)の 0.2% Dextrose/0.9% NaCl in DW を点滴して加える。1mL 加えた後は、沈殿を浮遊させるようにして加える
→遠心(2,000rpm, 5 分, RT)し、上清を除去する。
- v. 5mL CM で 2 回洗浄する
- vi. 50%RBC 200μL と 9.8mL の CM を加えて、培養(37℃, CO₂ 5%, O₂ 5%)する。

※解凍後は原虫の増殖が活発でなく、本来の増殖速度に戻るまでに数日かかることもある。

2.培地交換

- i. 培養容器の底に沈んでいる RBC を優しく揺らして剥がし、15mL チューブにいれて遠心(2,000rpm, 5 分, RT)する。

※培地の量が多い時は、培養容器をゆっくりと傾け、口の部分から上清のみをアスピレーターで吸って、全量を 15mL 以下にする(Fig.1)
※遠心する前に、培養液から 50μL をマイクロチューブに移し、卓上小型遠心機で数秒回し、上清をヘマトクリット 50%になるように除外して、血液塗抹を作成しておく(Fig.2)。

- ii. 塗抹の観察で parasitemia を算定しておく。

iii. 遠心後、チューブの目盛りを参考に大まかなペレットボリュームを確認し、上清を除く(Fig.3)

- iv. ヘマトクリットが 1%になるように 37℃に温めておいた CM を加え、培養を続ける。

※parasitemia が~1%の時は、2 日に 1 回の培養液の交換、1%以上の時は毎日培養液を交換する。

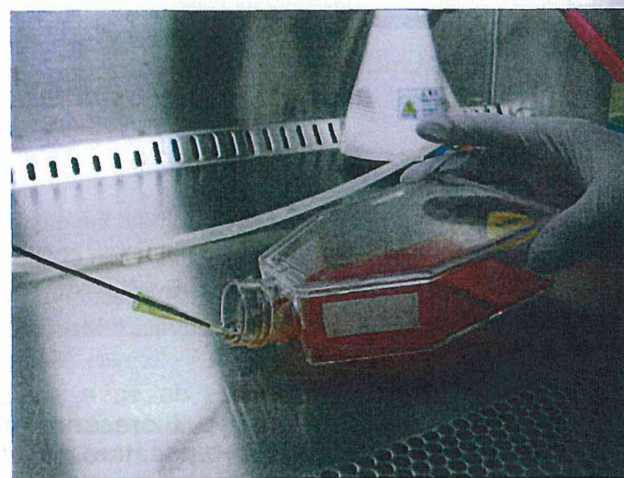


Fig.1 培地が多い時の上清除去



Fig.2 塗抹作成のためのヘマトクリット調整
上清を赤血球と同じ体積になるように吸い取る

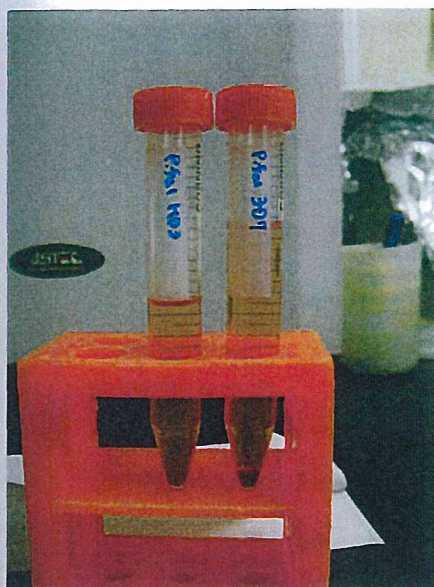


Fig.3 培養液遠心後
沈殿赤血球(ペレットボリューム)の量を、
この際に確認しておく

3.希釈

HB3 株を用いて大量培養したい場合は、以下の希釈の手順に従って RBC 量を増やしていく。

- ・ parasitemia が 18%以下の時
→ペレットボリュームの 2 倍量の 50%RBC 液を加える。
- ・ parasitemia が 18%以上の時
→parasitemia が 8~9% になるように 50%RBC 液を加える。

いずれの操作も、trophozoite-schizont のステージにおいて行う。

※ヘマトクリット 1%では、parasitemia が 20% 以上になると、増殖率が落ち、原虫の死骸が目立つようになる。

4.D-sorbitol を用いた同調培養法

この D-sorbitol を用いたプロトコルは煩雑な手技を伴わず、選択的にトロフォゾイト・シズントを破壊することで熱帯熱マラリア原虫をリング型に同調させることができる。

i.スメアの作成により、リング期の原虫が多い時期であることを確認する。

ii.培養液を遠心(2,000rpm, 5 分, RT)し、沈殿赤血球の量を確認する。

iii.沈殿赤血球の 9~10 倍量の 5% D-sorbitol 溶液を加えて、30 秒間ボルテックス→37℃で 8 分間振とう培養

iv.遠心(2,000rpm, 5 分, RT)して上清を除き、CM を 10mL 加えて 2 回洗浄し、培養を続ける他にも Percoll を用いてシズント期の原虫を濃縮させる方法(三田村, 2000)や、ヘパリンを用いて同調させる方法(小林ら, 2012)も存在する。

5.凍結保存法

- i.事前にスメアを作成し parasitemia を確認

しておく。

ii.parasitemia が 1%になるように新鮮 RBC で希釈し、遠心(2,000rpm, 5 分, RT)する

iii.沈殿 RBC ペレットと同体積の凍結保存液を加える。

iv.1mL ずつクライオチューブに分注していき-80℃で凍結する。

[結果]

先に示した方法で培養を行った時の、6/17~24 までの HB3 株の増殖についての結果を示す(Fig.4, 5)

①リング期とトロフォゾイト・シズント期が 24 時間ごとに交互にあらわれている。

②トロフォゾイト・シズント期に希釈を行うことで、total の parasitemia が 20%と比較的高い状態で毎日維持されている。

また、今回の方法で 3D7 株の培養を行ったところ、35%近くまで total の parasitemia を、問題なくあげることに成功した。

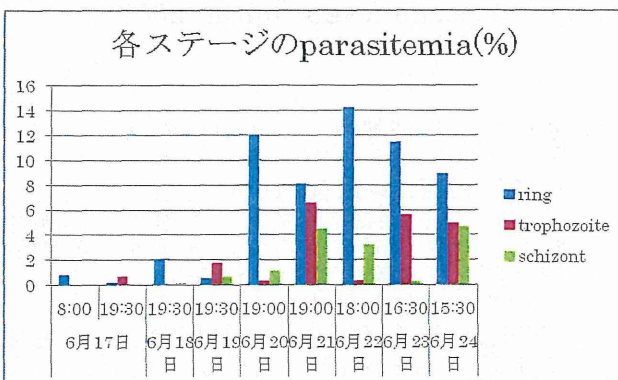


Fig.4 1週間の各ステージの parasitemia

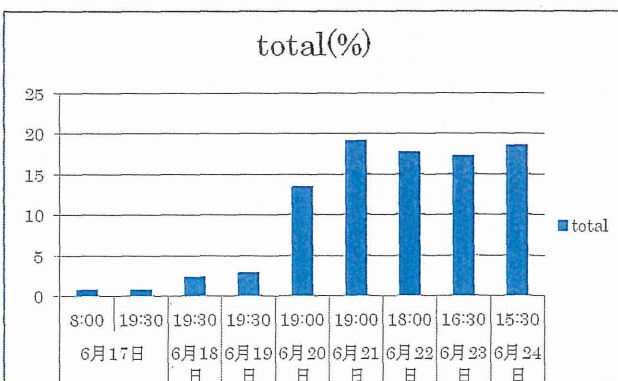


Fig.5 1週間の総 parasitemia 数

[考察]

熱帯熱マラリア原虫の培養は、赤内期における原虫を研究する際に必須である。また同調培養法は、原虫のあるステージにおけるプロテオーム解析など、同じ条件での原虫蛋白質を 1 度に量的に多く得る必要があるときに有用となる。

【謝辞】

本研究は、科学研究費補助金・若手研究、挑戦的萌芽研究、新学術領域研究、テニユアトラック普及・定着事業、厚生労働科学研究費補助金、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業、内藤記念科学奨励金により行われた。

【文献】

原著

- 1) Boyle M J, Richards J S, Gilson P R *et al.*: Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood*, 115: 4559-68, 2010
- 2) Azar Radfar, Darío Méndez, Carlos Moneriz *et al.*: Synchronous culture of *plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. *nprot*, 2009

成書

- 3) 脇誠司：熱帯熱マラリア原虫の培養法と凍結保存法. マラリア学ラボマニュアル, 紀伊國屋書店, 東京都, 2000, pp41-47
- 4) 三田村俊秀：熱帯熱マラリア原虫の同調培養法. マラリア学ラボマニュアル, 紀伊國屋書店, 東京都, 2000, pp55-59
- 5) 小林郷介、加藤健太郎：ヘパリンを用いた熱帯熱マラリア原虫の同調培養法. 寄生虫学研究:材料と方法, 三恵社, 愛知県, 2012, pp37-40

原虫プロテインキナーゼの酵素活性測定系

加藤健太郎

東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医微生物学研究室
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

[抄録] 細胞内のシグナル伝達系においてプロテインキナーゼ (PK) によるリン酸化は極めて重要な役割を果たしていることが知られている。原虫においても数十の PK がそのゲノムに保存されており、そのライフサイクルにおいて重要な役割を果たしているという研究報告がなされている。ここでは、原虫に保存されている PK のリン酸化活性の測定に使われる *in vitro* kinase assay の実際的な方法について紹介する。

キーワード；プロテインキナーゼ、熱帯熱マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、酵素活性測定系

Evaluation of enzyme activity of protozoan protein kinase using *in vitro* kinase assay

Kentaro Kato

Department of Veterinary Microbiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Abstract: Phosphorylation by cellular protein kinases (PK) has been reported to regulate important cellular processes. The protozoan genome contains tens of PKs. The protozoan PKs also have been reported to regulate important processes in its life cycle. In this report, the practical methods to calculate the phosphorylation activities of protozoan PKs using *in vitro* kinase assay are introduced.

Key Words: protein kinase, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *in vitro* kinase assay

[はじめに]

細胞内のシグナル伝達系においてプロテインキナーゼ (PK) によるリン酸化は極めて重要な役割を果たしていることが知られており、転写、翻訳、蛋白質合成、細胞周期、アポトーシスなどの細胞内のイベントを制御していると考えられている。2002 年以降、熱帯熱マラリア原虫をはじめとした原虫のゲノム情報がデータベース化され、これに伴い、原虫で保存されている PK の遺伝子情報は kinome として解析が進んでいる。この結果、Apicomplex 門に属する原虫では、カルシウム依存性プロテインキナーゼ (CDPK) など、植物型の PK が多数保存されていることが明らかとなり、副作用の無い抗原虫薬の標的候補分子として注目を浴びている (Kato K *et al.*, 2012)。

ここでは、筆者が原虫 PK の酵素活性を測定するために行っている *in vitro* kinase assay について紹介する。

[方法]

ここでは、筆者らが行ってきた *Plasmodium falciparum* 及び *Toxoplasma gondii* の PK の解析の経験 (文献 2-8) をもとに、その酵素活性測定系の実施例を以下に紹介する。なお、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を使用するため、放射性同位元素施設で実験を行う必要がある。放射性同位元素を使用しない方法を考えられるが、測定感度の面

では $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の使用を薦める。

1. 原虫 PK の発現

まず、原虫 PK 遺伝子を蛋白質発現用のベクターにクローニングする。筆者らは原虫 PK の発現系として小麦胚細胞蛋白質合成系及び組換えバキュロウイルス系を用い、GST との融合蛋白質の形で蛋白質の発現を行っている。クローニングする遺伝子部位は全長が好ましいが、解析対象によっては酵素活性部位のみのクローニングでも良い。

2. 原虫 PK の精製

GST 及び His タグ等との融合蛋白質として発現させた原虫 PK を glutathione-sepharose beads (GE Healthcare, UK) や Ni^{2+} -NTA agarose beads (Qiagen) を用いて精製し (図 1)、washing buffer (50mM Tris-HCl, pH 9.0, and 2mM DTT) で 2 回洗う。この後の解析に必要ながあれば、glutathione 等を用いて吸着したビーズから精製した原虫 PK を溶出して用いることも可能である。

3. *in vitro* kinase assay

精製した原虫 PK の酵素活性の測定を行う。自己リン酸化と基質のリン酸化の解析が可能である。基質のリン酸化を解析する場合は、原

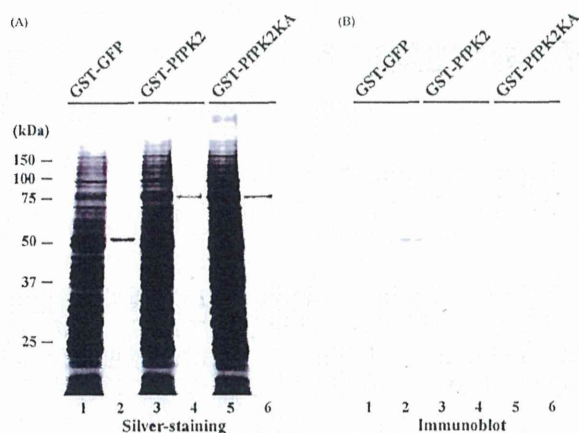


図1 GST融合蛋白質の精製。銀染色(A)、抗GST抗体を用いたImmunoblot(B)。精製前(奇数レーン)と精製後(偶数レーン)(Kato *et al.*, 2008)。

虫PKとともに基質蛋白質も一緒に混ぜてリン酸化反応を行う。kinase bufferの組成は基本的には、以下のものを使用している。50mM Tris-HCl, pH 8.0, 200mM NaCl, 50mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40, 1mM DTT。しかし、至適pH等を解析する場合はkinase bufferの組成を随時変更する必要がある。上記の蛋白質とともにkinase bufferに[γ-³²P]ATP (パーキンエルマー・NEG502Z)を1μl添加する。合計量で、筆者は20-100μlで行っている。通常の系では37℃、30分反応を行い、10分毎にタッピングを行う。反応後、TNE buffer (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA)で3回洗う。この際、³²Pを含む廃液の処理は放射性同位元素施設の指示に従って行う。

4. SDS-PAGEでの電気泳動と感光

酵素反応を終えた反応液に Loading bufferを加え、100℃、3分間煮沸し、SDS-PAGEで電気泳動する。泳動後、クマシーブリリアントブルー等で蛋白質の染色を行う。染色後、ゲルドライヤー等でゲルを乾燥させる。筆者はコスモ・バイオ株式会社のゲルドライヤーキットを使用している。乾燥後、X線フィルムに感光させる。感光時間は一昼夜以内で十分な場合が多いが、シグナルの強さによっては1週間以上感光させる場合もある。

[結果]

酵素活性の度合は、クマシーブリリアントブルーで染色したゲル上の蛋白質のバンドと対応するX線フィルム上のシグナルの濃さで判定することができる。酵素活性を定量する場合は、ゲル上の自己リン酸化を含む被リン酸化蛋白質のバンドを切り取り、ゲル断片の放射線量をシンチレーション検出器で計量することができる。

[考察]

冒頭にもふれたが、原虫PKは抗原虫薬の標的として注目されている。ここで紹介した原虫PKの酵素活性測定系では、各種のPK阻害薬を使用することで原虫PKに対する阻害の割合

を定量的に解析することも可能である。

[謝辞]

本研究は、文部科学省科学研究費補助金・若手研究(A)及び(B)、生物系特定産業技術研究支援センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業により、行われた。

[文献]

- 1) Kato K, Sugi T, Iwanaga T: Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage. *Parasitol Int*, 61:224-234, 2012
- 2) Kurokawa H, Kato K, Iwanaga T, et al.: Identification of *Toxoplasma gondii* cAMP dependent protein kinase and its role in the tachyzoite growth. *PLoS One*, 6: e22492, 2011
- 3) Sugi T, Kato K, Kobayashi K, et al.: 1NM-PP1 treatment of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Vet Med Sci*, 73:1377-9, 2011
- 4) Sugi T, Kato K, Kobayashi K, et al.: Use of the kinase inhibitor analog 1NM-PP1 reveals a role for *Toxoplasma gondii* CDPK1 in the invasion step. *Eukaryot Cell*, 9:667-70, 2010
- 5) Sugi T, Kato K, Kobayashi K, et al.: Molecular analyses of *Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3. *Parasitol Int*, 58:416-23, 2009
- 6) Kato K, Sudo A, Kobayashi K, et al.: Characterization of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 4. *Parasitol Int*, 58:394-400, 2009
- 7) Kato K, Sudo A, Kobayashi K, et al.: Characterization of *Plasmodium falciparum* protein kinase 2. *Mol Biochem Parasitol*, 162:87-95, 2008
- 8) Sudo A, Kato K, Kobayashi K, et al.: Susceptibility of *Plasmodium falciparum* cyclic AMP-dependent protein kinase and its mammalian homologue to the inhibitors. *Mol Biochem Parasitol*, 160:138-42, 2008