

## 6. 研究活動

### ① 分野別研究活動

節足動物衛生工学分野 教授 井上 昇

#### ○ミッション

井上研究室ではアフリカトリパノソーマ症 (African trypanosomiasis: AT) と非ツェツェ媒介性動物トリパノソーマ症 (non-tsetse transmitted animal trypanosomiasis: NTTAT) の疫学調査、フィールドでも実用可能な簡易迅速診断法の開発、ツェツェバエトリパノソーマ相互作用の解明ならびにトリパノソーマ細胞分化における遺伝子発現制御メカニズムの解明に関する研究を実施しています。

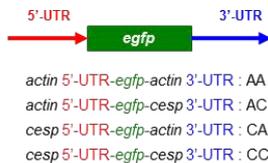


図1：異なるUTRを組合わせたeGFP発現カセット

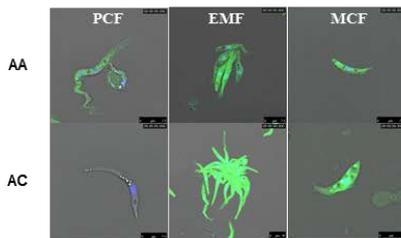


図2：図1のeGFP発現カセットを導入したトリパノソーマにおけるeGFP発現パターンの比較

#### ○ツェツェバエトリパノソーマ相互作用の解明

特にトリパノソーマの細胞接着分子機構について研究しています。我々の研究グループが世界で初めてクローニングに成功したトリパノソーマEMF発育ステージ特異的表面タンパク質(CESP)を手がかりにCESP遺伝子解析やRNA干渉法による遺伝子機能解析などを基盤技術として研究を推進しています。本研究によって宿主あるいはベクター内での原虫増殖を制御し、伝播阻止ワクチンなど新たな予防治療法開発へ展開することを目指しています。

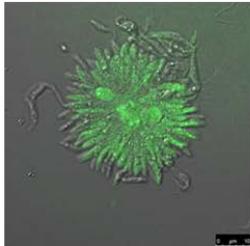


図6：培養系で増殖するEMF虫体のコロニー



図7：ツェツェバエの口吻部に寄生するEMF型虫体



図3：ザンビアでの疫学調査



図4：ザンビアの地図

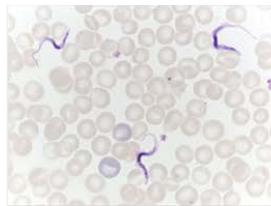


図5：ザンビアで捕獲したツェツェバエ唾液腺より分離した*T. b. rhodesiense*

#### ○フィールド調査

北大・人獣共通感染症研究センター杉本千尋教授と共同で、ザンビアの家畜およびツェツェバエのトリパノソーマ保有状況を調査し、効果的なトリパノソーマ症制圧策定を目指した研究を実施している。

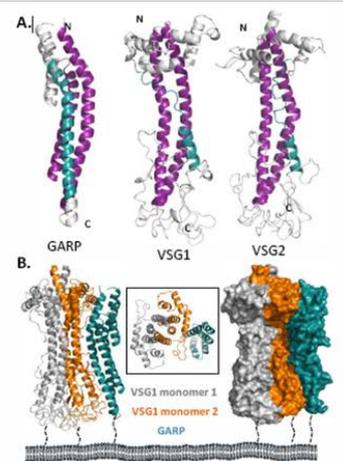
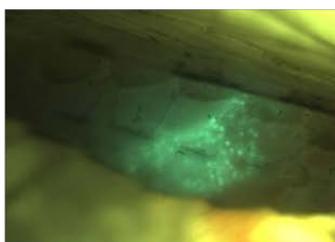


図8：国際共同研究で解明したGARPとVSGとの構造類似性。発育ステージ変化の際に脆弱な細胞膜を露出させずにVSG/GARP交換を行っている (Loveless et al. 2011, J. Biol. Chem. 286)

## 節足動物衛生工学分野 准教授 福本 晋也

節足動物によって媒介される感染症には、マalaria・西ナイル熱・日本脳炎・フィラリアなどがあります。これらの感染症の原因となる寄生虫・ウイルス・細菌の伝播には媒介節足動物、すなわち“ベクター”が必須となります。言いかえれば、病原体のベクターステージを断ち切ることによって、動物やヒトへの感染を防ぐことができます。このコンセプトに基づき、病原体がベクターの中でどのように振る舞っているのか？ベクターと病原体の間にはどのような相互作用があるのか？はたしてベクターにとって病原体とは何者なのか？このような事象について、病原体とベクター昆虫がおりなす“特有の生命現象”を徹底的に解析することで、ベクターのコントロールによる感染症の制御を実現するため研究を行っています。



ハマダラカ体内に育つマalaria原虫オーシスト（緑色）



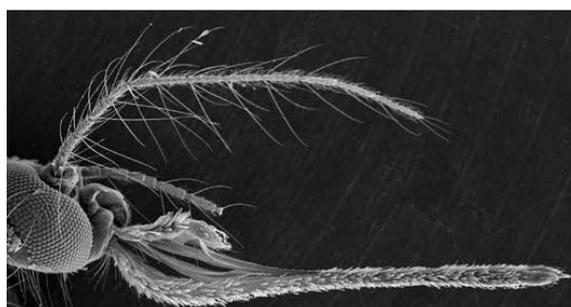
セラチア菌（緑色）を中腸に持つハマダラカ幼虫



節足動物飼育室（インセクトリウム）



サルモネラ菌が感染したショウジョウバエ（緑色）



*Aedes aegypti* の口器（走査電子顕微鏡写真）

### 主な研究課題

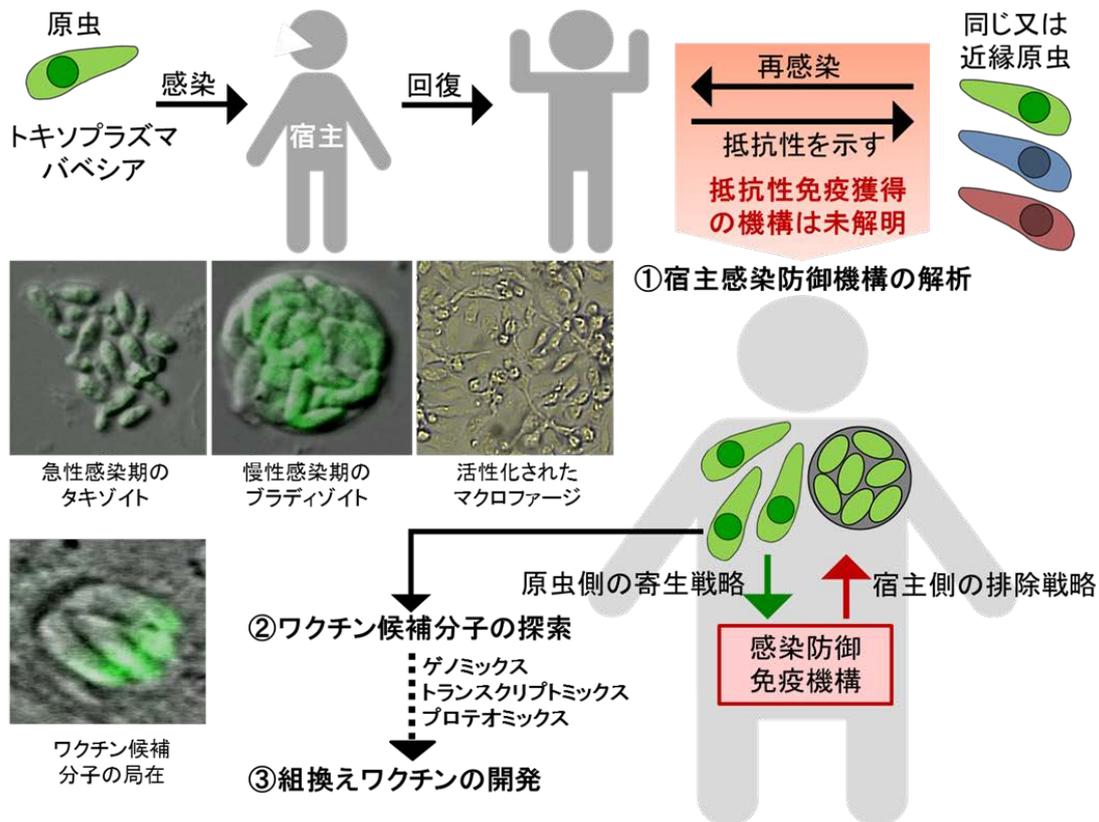
主に蚊などの節足動物とそれらによって媒介される病原体に着目し、表現型を重視した分子遺伝学的手法により節足動物が関わる生命現象を捉え、そのメカニズムを解明するというアプローチを取っています。

- 寄生虫と病原体媒介節足動物の相互作用
- 病原体感染における宿主抵抗性
- 病原体媒介節足動物のターゲット認識メカニズム
- 病原体媒介節足動物の抗ウイルス防御システム
- 病原体媒介節足動物の中腸に潜む微生物との相互作用
- 病原体媒介節足動物における「遺伝子診断技術」の開発

当研究室では、トキソプラズマ、バベシアなどの原虫感染に対する宿主の防御免疫機構の解明と感染防御免疫を有効に誘導しうる組換えワクチン開発に関する研究を行っています。

**主な研究課題**

- ・宿主感染防御免疫機構の解析  
原虫感染後に回復した宿主は同じ原虫或いは近縁原虫の再感染に抵抗性を示すことが多いが、その抵抗性免疫獲得の機構はまだよく分かっていないのです。そこで、原虫側の寄生戦略と宿主側の排除戦略の両側面から抵抗性免疫獲得の仕組みの解明を目指しています。
- ・ワクチン候補分子の探索  
原虫のゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析などによるゲノムワイドなワクチン候補分子の探索を行っています。このような総合的なアプローチにより従来の方法では発見できなかった新たなワクチン候補分子の発掘が期待されます。
- ・組換えワクチンの開発  
ワクチン候補分子を宿主免疫器官まで輸送し、感染防御免疫担当細胞を有効に刺激しうる組換えワクチン開発を行っています。ウイルスや原虫のベクター化の研究も行っています。



## 生体防御学分野 Research Unit for Host Defense

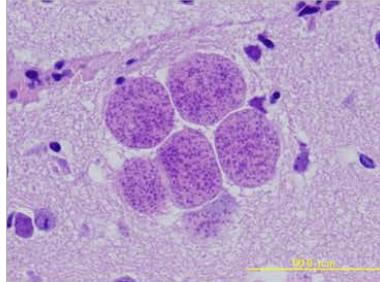
准教授 西川 義文

[http://www.obihiro.ac.jp/~geneticbiochem/member/nishikawa\\_1.htm](http://www.obihiro.ac.jp/~geneticbiochem/member/nishikawa_1.htm)

当研究室では、トキソプラズマ・ネオスポラ・マラリア原虫などの原虫感染における寄生体-宿主相互作用を理解し、難治性原虫感染症を克服できる新型ワクチンの開発を進めています。



TEL:0155-49-5886  
FAX:0155-49-5643  
E-mail: nishikawa@obihiro.ac.jp



Toxoplasma cysts in mouse brain

Localization of vaccine antigen in *Neospora tachyzoites*

## 主な研究課題

## (1) 新型ワクチンの開発

多機能性リポソームを利用することで、ワクチン抗原を効率よくリンパ系組織へ輸送し、免疫担当細胞を効果的に刺激できる新型次世代ワクチンの開発を行っています。マウス感染モデルと自然宿主を対象にした感染実験により、ワクチンの実用化を目指しています。

## 内閣府「最先端・次世代研究開発支援プログラム」

難治性原虫感染症に対する新規ワクチン技術の開発研究（研究代表者：西川義文）

## (2) 病態発症メカニズムの解明

原虫感染による宿主免疫攪乱メカニズムを理解するために、炎症反応や免疫抑制に関与する原虫因子の同定と解析を進めています。また、脳内に寄生する原虫に着目し、脳神経系の機能異常や宿主動物の行動変化に関する研究を行っています。

## (3) 地域と連携した疫学調査

日本国内（特に北海道）での原虫感染状況の把握と地域への貢献を目指し、ネオスポラ感染に関する診断・助言等を行っています。また、フィールドサンプルを用いた、原虫感染と家畜の繁殖障害との関連性を調査しています。

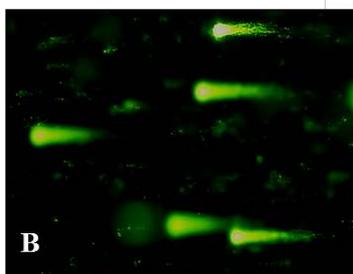
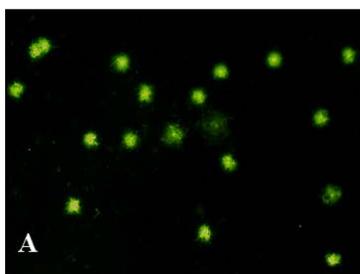
## (4) 生物資源を利用した新しい創薬

獣医畜産領域由来の生物資源（畜産生物資源）の潜在力に着目し、生体機能を制御する新規生理活性物質の発掘とその作用機序の解析を進めています。

## 主な発表論文 (Recent Publications)

- Tanaka S, Nishikawa Y. et al., Transcriptome Analysis of Mouse Brain Infected with *Toxoplasma gondii*. Infect Immun. In press.
- Nishimura M, Nishikawa Y. et al., Oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 induces protective immune response to *Neospora caninum* in cattle. Vaccine, in press. 帯広畜産大学大学プレスリリース(2013年6月6日)、日本経済新聞記事掲載(2013年6月7日)、十勝毎日新聞記事掲載(2013年6月7日)、北海道新聞記事掲載(2013年6月12日)
- Terkawi MA, Nishikawa Y. et al., (2013) Development of an Immunochromatographic Assay Based on Dense Granule Protein 7 for Serological Detection of *Toxoplasma gondii* Infection. Clin Vaccine Immunol. 20(4):596-601.
- Nishimura M, Nishikawa Y. et al., (2013) Tissue distribution of *Neospora caninum* in experimentally infected cattle. Clin Vaccine Immunol. 20(2):309-312.
- Ibrahim HM, Nishikawa Y. et al., (2009) *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18-mediated production of nitric oxide induces bradyzoite conversion in a CCR5-dependent manner. Infect Immun. 77(9):3686-3695.
- Nishikawa Y, et al., (2009) Immunization of oligomannose-coated liposome-entrapped NcGRA7 protects dams and offspring from *Neospora caninum* infection in mice. Clin Vaccine Immunol. 16(6):792-797.

発生工学的手法を駆使して、宿主・原虫のゲノム・遺伝子の機能を明らかにする原虫感染症の基盤研究、および発生・生殖工学の技術開発研究を推進しています。



野生型マウスの赤血球に感染したマラリア原虫の核(A)、 $\alpha$ -TTP欠損マウスの赤血球に感染した原虫のDNAは障害をうけている(B)

○発生工学的応用による原虫感染機構の解明

発生工学とは、バイオテクノロジーの一分野で、動物の発生過程を人工的に制御して新しい動物を作り出すことを目指すものです。医学・薬学あるいは獣医学領域におけるこの発生工学の魅力は、興味ある遺伝子の機能を動物の個体レベルで解析可能にすることにあります。例えば、培養細胞を用いて血圧の制御にかかわる遺伝子の機能を観察することは不可能ですが、発生工学は生体の高次機構の中で遺伝子機能を直接的に解析可能な検定系を提供できますので、その解析結果の臨床研究への応用展開も容易にさせるといえます。これまでに発生工学から生み出されたたくさんの遺伝子改変マウスが、生活習慣病、癌あるいは感染症などの理解のために活用されています。これには、原虫関連疾患も例外ではありません。当研究分野では、宿主の生理機能を修飾することによる原虫感染症の予防・治療の可能性を探索しています。

最近、ビタミンE転送タンパク欠損マウスを用いた解析から、宿主のビタミンE欠乏が原虫感染症に効果的に働くことがわかってきました。循環中のビタミンE濃度を規定するビタミン転送タンパクの機能不全は、脂溶性の抗酸化物質であるビタミンE欠乏を招きますが、宿主の循環中のビタミンE欠乏は、寄生マラリア原虫のDNA障害を惹起し増殖を抑制させる効果が認められました。この効果は、マラリア原虫のみならずトリパノソーマ原虫感染においても観察されたことから、広く宿主の循環中に寄生する原虫の増殖抑制に働くことが期待されます。

○発生・生殖工学の技術開発研究

バイオサイエンスの解析系を充実するためには、発生工学とそれを支える体外受精、胚移植、配偶子の凍結保存、凍結乾燥保存などの生殖工学の技術開発が不可欠です。当研究分野では、マウスを対象とした発生・生殖工学技術の深耕を図るとともに、この一連の技術を盲導犬をはじめとする補助犬の育成にも応用して、社会貢献を果たしています。最近では、世界で初めて凍結受精卵由来のイヌ産仔を得ることに成功しており、今後、盲導犬の普及への貢献が期待されています。

バベシア原虫、タイレリア原虫、リケッチア等の病原体を媒介する節足動物、マダニに関する研究を行っています。マダニのユニークな性質、特に「飢餓耐性」と「栄養代謝」に着目し、それらの分子機構の解明を目指しています。また、マダニは1個体あたり数千個にもおよぶ卵を産むことから、卵形成メカニズムにも焦点を当てた研究を行っています。

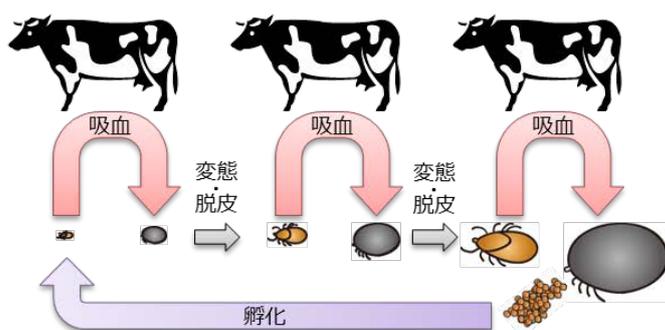


図1. マダニの生活史



図2. ウサギを用いたマダニの吸血



図3. 未吸血マダニの中腸(黒色)

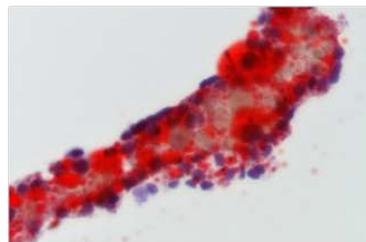


図4. 未吸血(飢餓状態)マダニの消化管(中腸)。脂質(赤色)に富んでいる。



図5. Target of rapamycin (TOR) ホモログをノックダウンしたマダニの吸血後5日目の卵巣(右)。対照マダニの卵巣(左)に比べて未成熟である。

### 主な研究課題

当研究室では、新たなマダニ制圧法の開発を目指し、フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* を材料として以下の課題に取り組んでいます。

#### ○マダニの飢餓耐性メカニズムの解明

マダニの多くの種には、卵・幼・若・成ダニ期の4つの発育期があり、1世代を終えるまでに数か月～数年を要します。吸血行動は、幼・若・成ダニ期に1回ずつ、計3回行われるのですが、すべての吸血期間を合計しても約30日に及びません。つまり、マダニは数年に及ぶ生活史の大半を未吸血・飢餓状態で過ごす強い生命の持ち主です。飢餓状態での長期間の生存を制御するメカニズムの解明を目指しています。

#### ○マダニの栄養代謝に関与する分子機構の解明

マダニの唯一の栄養源は脊椎動物の血液です。雌成ダニでは吸血後に卵黄タンパク質前駆体(ピテロジェニン; Vg)の合成が脂肪体と中腸で行われます。Vgは卵母細胞の発育に必要な不可欠のタンパク質であり、脂肪体におけるVg合成や卵母細胞におけるVg取り込み機構など卵形成を制御する分子機構の解明を目指しています。

#### ○マダニの変態を制御する分子機構の解明

幼ダニから若ダニ、若ダニから成ダニへと発育する過程(変態)において重要な役割を担うのがエクジソンというステロイドホルモンです。このホルモン制御下でどのような細胞内イベントが発生し、変態に伴う組織再構築を可能にするのか、そのメカニズムの解明を目指しています。

バベシア症を正確・迅速に診断する方法を開発し、その後の治療・予防対策に活用することおよび疫学的調査の実施や海外からのバベシア症の侵入を阻止することを目的としています。この目的達成のため、バベシアの培養やこれを用いた薬剤のスクリーニング、精度の高い血清診断、遺伝子診断などによる確定診断法の開発に関する研究を行っています。また、本研究ユニットは世界で初めて牛バベシア症と馬ピロプラズマ症の国際獣疫事務局（OIE）のリファレンスラボラトリーに認定されており、開発途上国のバベシア症研究者の育成や先進国の研究者との共同研究に基づいた国際的ネットワークを形成し、地球規模でのバベシア症汚染状況の疫学調査研究を推進しています。



**主な研究課題**

バベシア症を中心に、バベシア培養、バベシアの赤血球への侵入機能の解析などの基礎研究から、薬剤のスクリーニング、血清並びに遺伝子診断法の開発および疫学調査などの応用研究を行っています。

○バベシア培養法の検討

我国で初めてウシとウマバベシアの試験管内連続培養法を確立し、形態学および生化学的研究や新規薬剤のスクリーニングに応用しています。また、培養法を用いてバベシアを検出する確定診断に活用しています。

○バベシアの侵入・増殖機構の検討

バベシアが赤血球に侵入する機構や赤血球内の原虫の増殖・分裂に関する機構の解明を進めており、新しい薬剤やワクチン開発のための基礎的な検討を行っています。

○原虫感染症の診断法の開発

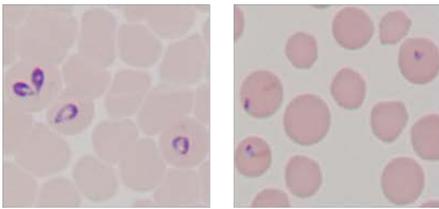
各種原虫の遺伝子解析により、診断に有効なバベシア抗原を同定し、組換え抗原を用いた簡便で迅速なELISA（酵素抗体法）やICT（イムノクロマト法）などの血清診断法、PCRやLAMPなどの遺伝子診断法を開発しています。

○OIEとの連携・世界規模の疫学調査

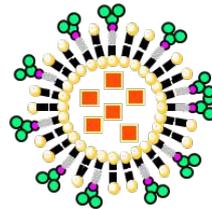
OIEのリファレンスラボラトリーとして、牛バベシア症と馬ピロプラズマ症に関する診断試薬の提供や技術的な指導・助言、インド馬研究所との馬ピロプラズマ症に関する連携プログラムにより、研究員の技術研修やセミナーなどを行っています。また、開発した診断法を用いてアジア・アフリカ・南米などにおいてバベシア症に関する世界規模での疫学的調査研究を行っています。

牛の住血性原虫感染症であるバベシア症及びタイレリア症の研究を行っています。これまでに、バベシアの赤内型増殖の分子メカニズムに関する基礎研究や、バベシア症やタイレリア症に対する診断法、治療法、及び予防法の開発研究に従事してきました。最近では、我が国に深刻な経済被害をもたらしている小型ピロプラズマ病のワクチン開発に成功しています。現在は開発した診断法を活用してバベシア症とタイレリア症に関する国内外の疫学調査を実施し、家畜原虫病の実態と問題点の把握並びに対応策の考案等の応用研究に取り組んでいます。

## 1) バベシアとタイレリア



## 2) リポソームワクチンの開発と牛試験



## 3) 疫学調査



## 主な研究課題

## ○バベシアの赤内型増殖に関する分子生物学的研究

ウシバベシアの試験管内培養法系を活用して、バベシアの赤血球への侵入や増殖、また脱出の分子メカニズムの解明を行っています。特に、赤血球膜上の受容体の同定や原虫独自の代謝機構並びに免疫回避機構の解明は、血管内溶血を引き起こすバベシアの制圧法の開発に不可欠な知見を与えてくれます。

## ○原虫感染症の遺伝子診断法の開発

バベシアやタイレリアに対する特異的な遺伝子診断法と遺伝子多型を同定できる簡易診断法を開発しています。また、各種原虫から得られる遺伝子情報から有効なワクチン候補抗原を探索します。

## ○ワクチンの開発研究

バベシアとタイレリアは牛に異なる貧血病態を引き起こし、それに応じてワクチン戦略は異なります。牛を用いた実験感染試験を実施し、流行国に適したワクチンを開発します。

## ○国内外の分子疫学調査

国内の獣医関連機関と連携し、バベシアやタイレリアの汚染状況の把握、貧血病態や免疫応答の解析、媒介マダニの同定などを行っています。さらに、得られた知見から現場にあった対応策を考案し現場に還元します。また、アジア、アフリカ、南米のネットワークを活用して世界の分子疫学調査を実施しています。得られた遺伝子資源はワクチンや診断法の開発に役立っています。

**マラリア** マラリア原虫細胞での、酸化ストレス応答とレドックス（酸化・還元）シグナル、カルシウムシグナルに着目しています。生物は細胞内の酸化・還元バランスやカルシウム振動を利用して、様々な生理機能を調節しています。マラリア原虫で、この仕組みやそこに働く分子の役割を「細胞を観ること」「イメージング実験」に重点を置いて調べています。一連の研究から、マラリアの新しい治療薬に繋がる生命の仕組みや分子が見つかることを期待しています。

**バベシア** バベシア原虫での遺伝子操作技術の開発を行っています。これまでに、外来遺伝子発現系（緑色蛍光タンパク発現原虫）や遺伝子ノックアウト系を開発し、同原虫の赤血球侵入機構や発育機構をライブイメージングによって「目に見える」形で明らかにしていこうとしています。

**日本住血吸虫** 日本住血吸虫症は、アジア諸国の農村で流行し、農村の保健衛生および家畜衛生と密接に関連した人獣共通感染症です。私達は、フィリピンの日本住血吸虫症流行地で、新たに開発したELISAプロトコルを応用した血清疫学調査をおこない、各流行地での保虫宿主探索も含めた総合的な疫学調査を行っています。またヒトおよび動物での同感染症の流行を正確にモニタリングする、ICTなど現地に即した簡易診断法の開発研究も行っています。

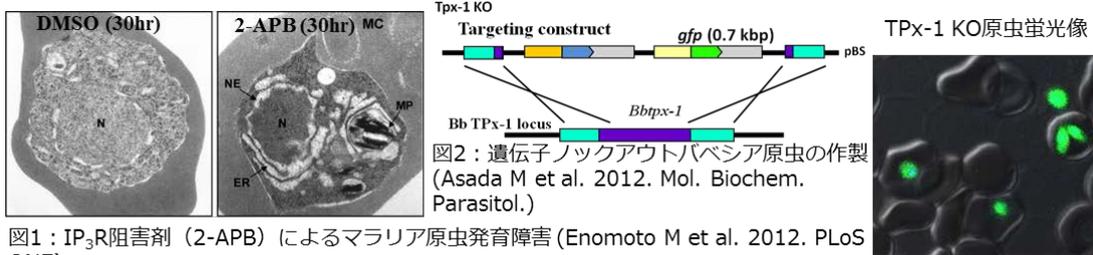


図1：IP<sub>3</sub>R阻害剤（2-APB）によるマラリア原虫発育障害 (Enomoto M et al. 2012. PLoS ONE)

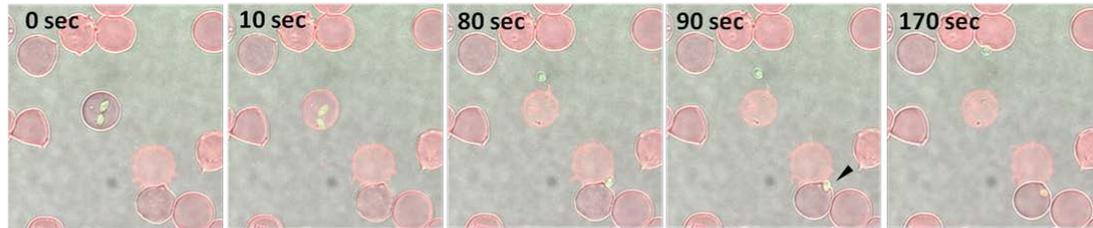


図3：GFP発現バベシア原虫が宿主赤血球より遊出し、滑走しながら新しい赤血球に侵入(矢頭)する様子 (Asada M et al. 2012. PLoS ONE)

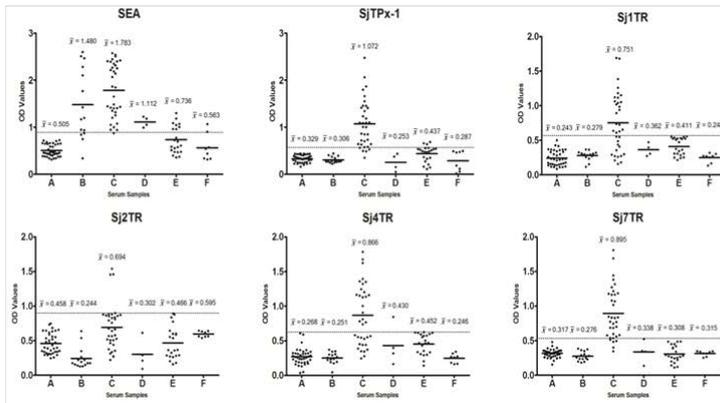


図4：虫卵粗抗原（SEA）及び組換え体抗原でのELISA。A, 非流行地の健康人血清。B, 流行地の健康人血清。C, 日本住血吸虫卵陽性者（患者）血清。D, 治療（1年）後患者血清。E, 肺吸虫症及び肝吸虫症患者血清。F, 原虫病患者血清。SjTPx-1とSj1TRの診断抗原としての有用性が示唆された。(Angeles JM et al. 2011. Am. J. Trop. Med. Hyg.)

トキソプラズマ原虫は世界人口の2~3割が不顕性感染し、妊婦から胎児への感染、HIV感染、加齢などによる免疫力の低下などにより、重篤な症状を引き起こします。当研究室では、原虫の宿主細胞内増殖機構の解析等の基礎研究を通じ、トキソプラズマ症の制御を目指しています。

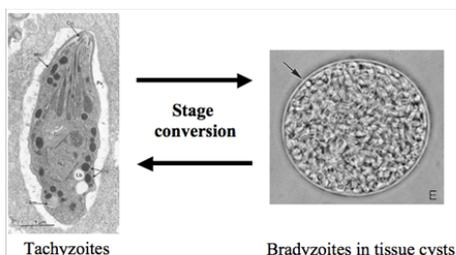


図1. トキソプラズマ原虫のステージ変換

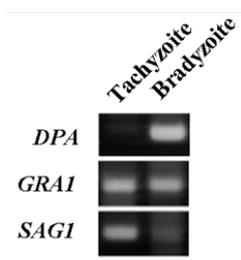


図2. ブラディゾイト特異的に発現するDPA分子の同定

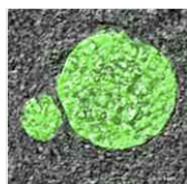
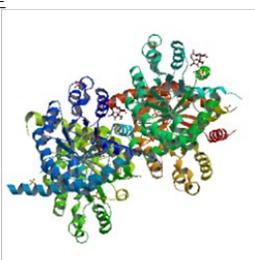


図3. DPA分子の脳内シストでの発現



主な研究課題

○トキソプラズマ原虫の宿主細胞内寄生機構の解明

トキソプラズマ原虫をモデルとして、原虫の宿主細胞内への寄生戦略の一端を明らかにすることを目指しています。

○トキソプラズマ原虫の宿主細胞内侵入機構の解明

トキソプラズマ原虫の宿主細胞への侵入に関わる分子の同定を試み、新たな薬剤標的分子としての有用性を検討することを目的としています。

○トキソプラズマ原虫の急性感染から慢性感染への移行過程の解析

トキソプラズマ原虫は急性感染から慢性感染への移行に伴い、その生活環を増殖型からシスト形成型へと変化させます。その機構を明らかにすることにより、ワクチン開発の戦略に役立たせることを目指しています。

トキソプラズマ原虫ステージ変換の分子機構

急性期におけるタキゾイト（増殖型）から慢性期におけるブラディゾイト（シスト形成型）への原虫のステージ変換の分子機構は、ほとんど明らかにされていません（図1）。我々は、この機構の一端を明らかにする目的で、ブラディゾイト特異的に発現する分子を同定し、遺伝子の破壊などの手法を用いてその機能の解析を行なっています。

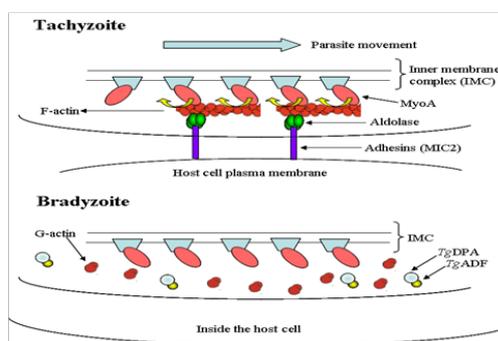
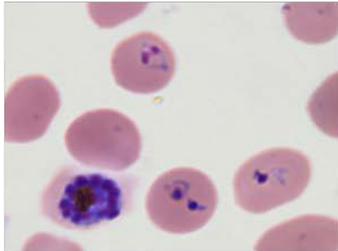


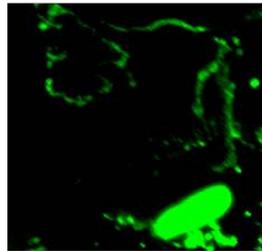
図4. 生化学的解析により、DPA分子はアクチン脱重合因子TgADFを介し、アクチンの重合・脱重合を制御することにより、ブラディゾイトの静的動態を維持していると予想された。（上野ら、Mol. Biochem. Parasitol. 193, 39-42. 2010）

## 地球規模感染症学分野 特任准教授 加藤 健太郎

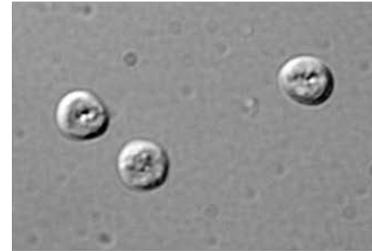
世界三大感染症の1つであるマラリア原虫（熱帯熱マラリア原虫、ローデントマラリア原虫）と人獣共通感染症として地球規模で問題となっているトキソプラズマ原虫、クリプトスポリジウム原虫を研究対象とし、「如何にして病原微生物は宿主細胞に感染し、増殖するのか」という命題について、主に分子生物学、ウイルス学的手法をもってアプローチしています。さらに、ここで得られた知見を基にした新しい抗原虫薬、原虫ワクチンの開発等の実用的な研究課題にも取り組んでいます。



熱帯熱マラリア原虫（ギムザ染色像）



トキソプラズマ原虫の滑走運動



クリプトスポリジウム原虫のオーシスト  
(Sugi T et al. *Eukaryot Cell*. 9:667-670.)

### 主な研究課題

#### ○原虫の宿主細胞侵入機構の解明

アピコンプレックス門に属する原虫は宿主細胞に侵入（感染）する際に、虫体と宿主細胞との間に moving junction と呼ばれる構造物を形成し、glideosome と呼ばれる動力装置を使って侵入するモデルが提唱されています。この原虫の宿主細胞侵入の分子メカニズムの解明を行っています。

#### ○原虫のライフサイクルにおける原虫酵素の役割の解明

原虫は他の生物種には見られない複雑なライフサイクルを持っています。この複雑なライフサイクルの維持・移行を制御している分子の1つが、原虫の持つ酵素です。これらの酵素の中でも特に原虫プロテインキナーゼに注目し、その役割の解析と薬剤ターゲットとしての可能性について検討しています。

#### ○原虫の感染レセプターの同定

我々が確立に成功したウイルスベクターを用いた原虫感染レセプター同定系等を駆使して、レセプターの同定を行っています。特に我々が同定した糖鎖レセプターの知見を基にして、抗原虫薬として糖鎖薬の実用化に向けた研究を進めています。

#### ○原虫のエピジェネティック機構の解明

原虫のヒストン修飾のエピジェネティック機構の解明とその応用技術の開発を行っています。

### 主な研究業績 (Major publications)

1. Sugi T, Kobayashi K, Gong H, Takemae H, Ishiwa A, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, **Kato K (corresponding author)**. Identification of mutations in TgMAPK1 of *Toxoplasma gondii* conferring the resistance to 1NM-PP1. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 3: 93-101. (2013) 帯広畜産大学プレスリリース、東京大学大学院農学生命科学研究科プレスリリース（2013年5月29日）、十勝毎日新聞記事掲載（2013年6月3日22面）、北海道新聞記事掲載（2013年6月8日25面）
2. Kobayashi K, **Kato K (corresponding author)**, Sugi T, Takemae H, Pandey K, Gong H, Tohya Y, Akashi H. *Plasmodium falciparum* BAEBL binds to heparan sulfate proteoglycans on the human erythrocyte surface. *J Biol Chem*. 285:1716-1725. (2010) 東京大学農学生命科学研究科プレスリリース（2010年1月13日）、日刊工業新聞記事掲載（2010年1月21日22面）
3. **Kato K**, Mayer DC, Singh S, Reid M, Miller LH. Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:5552-5557. (2005)
4. Sijwali PS<sup>†</sup>, **Kato K<sup>†</sup> (contributed equally.)**, Seydel KB, Gut J, Lehman J, Klemba M, Goldberg DE, Miller LH, Rosenthal PJ. *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:8721-8726. (2004)

② 平成 25 年度学術賞などの受賞者

専任教員

該当者なし

博士課程学生

該当者なし

### ③ 共同利用・共同研究課題の概要

	課題名	研究概要
1	フィリピンの家畜動物における住血性病原体の分子疫学調査	原虫を含むベクター媒介性住血性病原体は感染動物に消耗性慢性疾患を引き起こし、世界中で畜産界に多大な被害を与えている。現在のところ、そのほとんどが有効な治療薬やワクチンがない。また、十分な診断技術が世界に普及しておらず、その蔓延実態が不明な国は多い。本研究では、我々が確立した手法を用いて、フィリピン、とくにセブ島を中心とする家畜動物における住血性病原体(バベシア、タイレリア、トリパノソーマおよびアナプラズマ)の分子疫学調査を実施する。
2	マダニの鉄代謝におけるフェリチンの役割について	マダニにとって必須の生存基盤が宿主動物からの吸血・消化にあり、血液消化産物中に含まれるヘモグロビン由来のヘムやトランスフェリンから大量の鉄分子がマダニ体内に放出される可能性が考えられる。申請者はマダニ体内で鉄代謝の重要な役割を担うことが予想されるフェリチンの特性について調べたところ、マダニの吸血や産卵において、フェリチンは鉄分子の供給や鉄分子の毒性に対して、制御的役割を果たす必須な分子であることを見出し、詳細な解析を進めているところである。そこで、本共同研究では、鉄をマダニに投与し、マダニ体内の鉄に対するフェリチンの影響を調べ、フェリチンの鉄代謝における役割について明らかにすることを主要目的とした。
3	ヒト由来サポニン類を標的とした抗原虫活性物質の探索	サポニンとはステロイドまたはトリテルペノイド配糖体の総称で、棘皮動物(特にヒトデやナマコ)は多様なサポニン類を含むため、機能性サポニンの探索源として有望である。研究代表者および研究分担者はヒトデ類(マヒトデ、イトマキヒトデ、フサトゲニチリンヒトデなど)から調製したサポニン粗精製物をマウスに注射すると、マウスがトキソプラズマ原虫に対して耐性(抗トキソプラズマ活性)を示すという暫定的な結果を得た。そこで、本研究では抗トキソプラズマ活性を示すサポニンの単離・精製を試みた。
4	イヌバベシア原虫のゲノム解析	<i>Babesia gibsoni</i> は宿主であるイヌの赤血球に寄生することでイヌバベシア症を引き起こす。感染によりイヌは貧血、黄疸、血色素尿などの症状を呈し、死に至る場合もある。その治療にはジミナゼン等が使用されている。しかしながら、副作用が強いことや耐性株の出現などの問題点が指摘されている。また、効果的なワクチンも開発されていない。そこで本研究では、未だ報告のない <i>B. gibsoni</i> の全ゲノム配列を決定し、有効な治療法や組換えワクチン開発に資する情報基盤の確立を目的として解析を行う。
5	バベシア感染に伴う抗赤血球抗体の産生とその機能	イヌやウシのバベシア症においては、自身の赤血球に反応する抗体が産生されることが古くから知られている。このような自己抗体はバベシア症と自己溶血性免疫性貧血との鑑別を困難にするだけでなく、自己抗体による赤血球の破壊そのものがバベシア症における貧血の病態に関与している可能性が指摘されてきた。しかし、これまで自己抗体と溶血・貧血との関わりを実験的に証明した例はない。申請者はマウスに <i>Babesia rodhaini</i> を感染させることで短期間のうちに抗赤血球抗体を誘導できることを見出している。本研究ではこのマウスモデルを用い、バベシア感染に続発して誘導される抗体が生体内で実際に溶血性貧血を起こすか否かマウスモデルを用いて実験的に検証する。

## 共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
6	マラリア原虫感染症に対する高脂血症治療薬プロブコール等の血中ビタミン E 濃度に影響する薬物の効果に関する研究	マラリア感染症は世界で 100 カ国以上にみられ、世界保健機関 (WHO) の推計によると、年間 3~5 億人の罹患者と 150~270 万人の死亡者とされている。マラリア感染に対する治療や予防にはクロロキンを始めとした投薬が行われるが、強い副作用があること、クロロキン耐性のマラリア原虫の存在などのため、現在も治療薬、治療法の開発が行われている。一方、ビタミン E の欠乏がマラリア感染症状を抑制することが知られていたが、ビタミン E は様々な食物に含有されており、治療の目的のためにビタミン E の欠乏を利用することは困難であると考えられていた。しかし、ビタミン E 減少効果を有する薬物を使用すれば、マラリア発生地域への渡航者への予防投与や、感染時のビタミン E 欠乏食との併用、マラリア治療薬との併用によるクロロキンなどの治療薬の減量などの効果が期待できる。
7	ミコフェノール酸をリード化合物とした原虫 IMPDH 特異的阻害剤の研究開発	原虫感染症は畜産・獣医学領域のみならず、医学領域においても甚大な被害を与えている。根本的な原虫病の撲滅のためには、原虫独特の生活環の解明と、優れた抗原虫薬の開発が求められる。本研究では原虫のイノシンーリン酸脱水素酵素 (IMPDH) の酵素学的性質及び構造が、ヒトのそれと大きく異なる事に着目し、原虫 IMPDH 特異的阻害剤の創製を目的とする。まず、ヒト及びクリプトスポリジウム原虫の組換え IMPDH を調製する。次にヒト IMPDH 阻害剤であるミコフェノール酸 (MPA) の誘導体をデザイン合成し、得られた MPA 誘導体の IMPDH 阻害活性を測定する。それら構造活性相関の結果を、原虫 IMPDH 特異的阻害剤の新規開発に繋げる。
8	非感染性ウイルスベクターを用いた新規三日熱マラリアワクチンの開発研究	【研究目的】 非感染性ウイルスベクターシステムである Baculovirus Dual Expression System (BDES) は、CMV プロモーターとポリヘドリンプロモーターを連結することによりワクチン抗原をバキュロウイルス表面にディスプレイさせ、さらに哺乳類細胞で発現させることができる新規ワクチンプラットフォームシステムである。我々はこのシステムを用いて、三日熱マラリア (Pv) の各ステージに対応するスペクトルの広い、より効果的なマルチステージワクチンの開発研究を行う。 【趣旨】 本共同研究で使用する BDES は三日熱マラリアだけでなく、家畜や家禽の原虫病や感染症にも応用可能であるため、帯広畜産大学との本共同研究は動物用ワクチン開発のプロジェクト研究を提案する契機となる。

## 共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
9	次世代シーケンサーを用いたトキソプラズマ感染脳細胞におけるトランスクリプトーム	トキソプラズマは細胞内寄生性原虫であり、慢性感染時には脳内に存在することが知られている。脳内でトキソプラズマはミクログリア、アストロサイト、ニューロンに感染し、シストを形成して神経系障害を引き起こすことが知られているが、その発症の詳細なメカニズムについては解明されていない。我々はこれまで、トキソプラズマに感染させたマウスの脳のトランスクリプトーム解析を行っている。その結果、トキソプラズマの感染によって、マウス脳内では免疫に関与する遺伝子発現、特にケモカインの発現が増加し、神経系に関わる遺伝子発現が低下するという結果を得ている。しかしながら、トキソプラズマの感染によって遺伝子発現が変化する細胞種の同定はできていない。また、トキソプラズマは宿主細胞のTLR を介して免疫のシグナルを伝えることが報告されているため、トキソプラズマは宿主細胞に発現する TLR やケモカインレセプターを介して、免疫反応を惹起し、神経系機能の変化を及ぼすことが予想される。本研究では、トキソプラズマ感染で引き起こされる神経系障害に関与する宿主因子、原虫因子の機能の解明とその発症メカニズムを明らかにすることを目的とする。
10	日本各地におけるクリプトスポリジウム症の疫学調査	クリプトスポリジウム属は脊椎動物の消化管に寄生して下痢を引き起こす。20 日齢以下の子牛はクリプトスポリジウムに感受性が高く、下痢症が慢性化した場合、有効な治療薬がないことから重度の栄養不良と代謝性アシドーシスを呈して死亡する例もある。牛寄生のクリプトスポリジウムには、小腸粘膜に寄生する <i>Cryptosporidium parvum</i> と、第 4 胃粘膜に寄生する <i>C. andersoni</i> に加えて他 5 種の報告がある。特に <i>C. parvum</i> は家畜やヒトの下痢症の原因となる人獣共通感染症として公衆衛生学的にも重要である。クリプトスポリジウム症が畜産業に与える経済的損失は甚大であるため有効な治療薬および消毒法の開発が急務である。これらの研究開発には、各地域のクリプトスポリジウムの流行種および遺伝的多様性について正確な情報を得ることが第一に求められる。しかしながら、我が国において疫学調査は十分に実施されていない。そこで、本研究では日本各地から子牛の下痢便を採取し、各地域のクリプトスポリジウムの遺伝的多様性の有無について調査することを目的とする。

## 共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課題名	研究概要
11	マダニの血液消化や栄養等のシグナル伝達経路に関する活性化メカニズムの解析	マダニは、獣医学・医学上重要な外部寄生虫であり、吸血時に病原体を媒介するベクターでもある。畜産物の生産性向上を目標とし、マダニとマダニ媒介感染症の制御のため殺ダニ剤によるマダニ対策が講じられているが、不適切な使用(低濃度・頻回多用など)により抵抗性を獲得したマダニの出現が世界的に問題となっている。そのため、抵抗性の出現にも配慮した効果的なマダニ防除法の開発が重要な課題となる。マダニの生活上、個体群維持に必須である雌成ダニの産卵プロセスは、血液消化による栄養の摂取、1 個体あたり数千個にも及ぶ大量の卵形成と産出の過程で構成される。また、バベシア等の病原体は介卵伝播することからも、マダニとマダニ媒介病原体の制圧のために解明すべき生命現象の一つであり、その生理現象の分子論的理解は上記課題を解決するトピックの一つと言える。マダニの産卵数は、吸血血液の「量」に依存することが以前から知られているが、申請者らはその『質』(血液の構成成分)についても考察を加えるべきであると考えている。そこで本研究では、申請者が既に確立した人工吸血法(Hatta et al., 2012; Parasit Vectors 5: 263.)を応用し、中腸臓器における血液消化分子ネットワークや、卵黄タンパク質前駆体合成に関連する Target of rapamycin (TOR) 経路(Umemiya-Shirafuji et al., 2012; Int J Parasitol 42:991-998.)シグナル伝達の活性化メカニズムの解明を図るべく、複数種の血液溶液を人工吸血させたマダニの血液消化や産卵に関わる表現型について評価することを目的とした。
12	マラリア原虫感染赤血球がマウス妊娠機構に及ぼす影響	マラリアは世界の 3 大感染症の一つに挙げられ、妊婦がマラリアに罹患した場合は症状が重篤化する。妊婦がマラリアに罹患した場合、通常の感染に比べて重度の発熱や貧血が起きることに加え、胎児の子宮内死亡・低体重・未熟児出産などが誘発され、その要因として胎盤にマラリア感染赤血球が集積することが考えられている。しかし、マラリア原虫がどのような機構で母体および胎児に悪影響を及ぼすのか、妊娠時特異的に重篤化する機構は分かっていない。本研究では、胎盤の構造が霊長類よりもヒトと類似しているマウスを用いて実験解析モデルを確立し、妊婦のマラリア罹患症状を克服することを最終目標とし、マラリア原虫感染による妊娠母体・胎仔への影響を生体レベルで理解することを目指す。
13	東南アジアの住血吸虫症の新規診断法開発のための抗原解析	東南アジアや中国に分布し問題となっている日本住血吸虫症およびメコン住血吸虫症について、有病地での使用に有効な診断法が開発が望まれている。しかしながら現在我々が使用している虫卵粗抽出物を抗原とした免疫診断法は感度が高いものの抗原の供給が限られるため一般化には限界がある。本研究は、本症検査に好適な標的分子であることが期待される抗原について、その性状やアミノ酸配列、さらに遺伝子配列などの解析を進め、本症診断に応用することを目的とする。さらには、有用な抗原候補分子について組替え体抗原を作製し、免疫クロマトグラフィー法(ICT)の開発につなげていきたい。

## 共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
14	バベシア原虫メロゾイトの赤血球遊出・滑走・侵入に関わるカルシウムイオン動態のライブイメージング解析	バベシア原虫はアピコンプレクサ門に属し、ウシなどに感染し家畜に多大な経済的損失を与える住血原虫である。マラリア原虫やトキソプラズマ原虫等、同門の原虫は宿主細胞からの脱出や侵入にカルシウムイオン(Ca <sup>2+</sup> )を利用していることが知られている。申請者はウシのバベシア原虫 <i>B. bovis</i> において緑色蛍光タンパク(GFP)を発現する原虫を作出し、同原虫メロゾイトが赤血球より遊出し、滑走運動を行いながら新たな赤血球に侵入する様子を撮影することに成功した。しかしながら、バベシア原虫においてメロゾイトの宿主赤血球への遊出・滑走・侵入における Ca <sup>2+</sup> の役割はほとんど明らかとなっていない。本申請課題ではバベシア原虫の宿主赤血球への遊出・滑走・侵入における Ca <sup>2+</sup> の役割を明らかにすることを目的としている。
15	ヒトバベシア症の診断法の開発研究	本研究においては、五十嵐郁男教授らが開発したバベシア診断法( <i>BmSA1</i> を用いた抗体検出クロマトグラフィー法/ELISA 法、LAMP 法など)の実用性について、研究代表者が有する試料、新たに入手した試料などを用いて詳細な検討を行う。また、研究代表者らは、各遺伝子型の主要抗原のクローニング/同定を進め、五十嵐郁男教授らのグループは、同定された抗原について、抗体または抗原検出クロマトグラフィー法や ELISA 法などへの適応可能性について検討を行う。本研究は、以上の研究を行うことにより、より実用性の高いヒトバベシア症の診断法を確立することを目的とする。
16	北海道十勝地方に棲息する野生鳥獣の腸管寄生性原虫相調査	十勝地方には野鳥を始めとする多彩な野生動物が生息し、それらの野生動物に多くの原虫寄生虫が感染していることが分かっている。特に、腸管寄生性の寄生虫は、家畜感染レズルボアとなっている可能性が高く、その実態についての理解が必要である。今回の研究は、原虫病研究センターの福本晋也准教授により住血原虫相の調査のために集められた十勝地方の鳥獣検体を用い、その腸管から腸管寄生虫を含む糞便検体を採取することで、感染原虫のより総合的な研究を行うことを目的とする。また、申請者の所属する国際家畜感染症防疫研究教育センターで稼働する次世代シーケンサーにより、網羅的な手法によって新種の原虫因子を発見することを目的とする。

## 共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
17	抗生物質など天然由来化合物の抗バベシア活性評価と新規治療・予防薬への応用	北里大学北里生命科学研究所熱帯病評価センター(以下、北里大学)では微生物代謝産物などの天然物を創薬資源として <i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> の抗マラリアおよび抗トリパノソーマ原虫活性物質を探索している。今までに数百余種の化合物について抗マラリアおよび抗トリパノソーマ活性を見出しており、一部の化合物はリード化合物として種々の誘導体を作成し創薬研究を行っている。動物の neglected disease の一つとしてバベシア症が注目されてきている。バベシアもマラリア原虫やトリパノソーマ原虫と同様に住血原虫であり、一部の抗マラリア剤、抗トリパノソーマ剤は抗バベシア効果を示すことが明らかになっており、抗マラリア、抗トリパノソーマ原虫活性との比較からバベシアの新たな生物学的知見が得られる可能性も示されている。このような背景のもと、これまで抗マラリアおよび抗トリパノソーマ原虫活性物質として取得した化合物のバベシアに対する作用を <i>in vitro</i> 培養系に加えて <i>in vivo</i> マウス実験系で検証してきた。H25 年度も培養原虫での検討を継続する。更に評価が先行している化合物(BF90673)については大型動物での検討を推進し、バベシア症治療薬としての応用、更にはバベシアの生化学的アプローチへのツールとしての可能性を見出す。

#### ④共同研究成果報告会

目的:共同研究の成果を当研究センターのメンバーと共有することを目的とし、今後のさらなる発展につなげる。

報告者:平成25年度において共同研究を推し進めている先生の中から、過去3年間の共同研究の実績を考慮して参加を依頼した。

参加者(座長)

猪熊壽 先生 (横山)

鈴木讓 先生(玄)

田仲哲也 先生 (白藤)

高島康弘 先生 (五十嵐郁男)

吉田栄人 先生 水谷先生(福本)

狩野繁之 先生 (評議員)

日時:9月26日(木)

場所:原虫病研究センターPK ホール

#### 共同研究成果報告会プログラム

日時:平成25年9月26日(木)午後2時20分より

場所:帯広畜産大学原虫病研究センターPK ホール

14:20 共同研究の現状および将来の展望(開会のあいさつ)

鈴木宏志センター長

14:30 北海道道東地区放牧牛の新規小型ピロプラズマ症対策

猪熊壽 先生 (横山)

15:00 次世代シーケンサーを用いたトキソプラズマ原虫の遺伝子発現解析

鈴木讓 先生(玄)

15:30 鉄依存性酸化ストレスからフタトゲチマダニを保護するフェリチンの役割

田仲哲也 先生 (白藤)

16:00 バベシア感染に伴う抗赤血球抗体の産生とその機能

高島康弘 先生（五十嵐郁男）

16:30 Baculovirus Dual Expression System を用いた三日熱マラリア感染防御—  
伝播阻止2価ワクチンの開発研究

水谷征法先生、吉田栄人 先生(福本)

17:00 閉会のあいさつ

狩野繁之 先生

## ⑤ 主な研究成果の概要

年 月	研究成果の概要	学術的意義又は社会・経済・文化的意義	関係研究者名
H25 年 5 月	トキソプラズマの新規抗原虫薬候補「こぶつきキナーゼ阻害剤」への耐性獲得機構の解明を行った。	薬剤耐性の獲得されにくい原虫薬の開発につながる事が期待される。	杉達紀(特別研究学生:大学院生)、加藤健太郎
H25 年 9 月	アフリカトリパノソーマゲノムとタンパク質の網羅的解析によって新規の特異的診断用抗原を同定することに成功した。	診断用抗原の探索にバイオインフォマティクスを活用することによって、現在標準化された血清診断法がほとんどないアフリカトリパノソーマ病に対して、組換えタンパク質を用いた高感度で正確な診断法を短期間で開発することが可能となる。	モチャボ ケネディー(大学院生)、周末(大学院生)、菅沼啓輔(大学院生)、河津信一郎、井上昇
H25 年 12 月	アジア(日本、モンゴル、中国、ベトナム、フィリピン、タイ、スリランカ)、アフリカ(ガーナ、南アフリカ)、南米(ブラジル)で飼育されている牛や馬の血液やマダニから様々な住血性病原体(バベシア、タイレリア、トリパノソーマ、アナプラズマ)を検出・解析し、その世界的分布や遺伝子多型について明らかにした。	家畜動物に被害を与える住血性病原体の国際疫学調査の成果は、個々の国々の家畜衛生対策の技術向上に役立つのみならず、世界規模の動物資源の安定供給などグローバル社会に大きく寄与する。	横山直明、Sivakumar, T.(大学院生)、Ybanes, A.P.(大学院生)、Battsetseg, B.(モンゴル農業大学獣医学研究所)、Huang, X.(福建師範大学)、Lan, D.T.B.(フエ大学)、Inpankaew, T.(カセサート大学)、Alhassan, A.(Veterinary Services Laboratory)、Thekiso, O.M.M.(フリーステート大学)、de Macido, A. C.(大学院生)、猪熊壽、五十嵐郁男など
H26 年 3 月	熱帯熱マラリア原虫赤血球型の増殖において、カルシウム振動とアデニル酸シクラーゼ-cAMP シグナル伝達経路が重要な役割を担うことを明らかにした。	カルシウム振動及びアデニル酸シクラーゼ-cAMP 経路に係わる分子を標的とする新規マラリア制御法の開発が期待される。	河津信一郎、古山若呼(北海道大学大学院生)、川合覚(獨協医大)、榎本匡宏(理化研)、御子柴克彦(理化研)

## ⑥ 診断検査業務

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
ブルセラ抗体検査	0	34	12	5	12	6	4	1	10	1	4	0	89
PRCD-PRA遺伝子検査	2	14	7	3	11	2	2	0	9	0	8	0	58
馬ピロプラズマ症確定診断	0	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0	4
ネオスポラ抗体検査	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
マダニからの小型ピロプラズマの検査	0	0	850	700	0	100	2	0	0	0	0	0	1652
放牧牛からの小型ピロプラズマの検査	0	100	0	108	52	4	8	198	8	0	0	1	479
ハシブトカラス・クロアカスワップ	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14
十勝管内ネコのトキソプラズマ抗体価測定および糞便中オーシストの検査	0	0	0	0	0	0	6	8	9	7	8	6	44
その他	5月 バベシア症診断法の国際評価のサンプル授受 6月 バベシア症診断法の国際評価のサンプル授受 10月 バベシア症、アナプラズマ症サンプルを用いた診断法の国際評価試験を実施 11月 イリオモテヤマネコのフィラリア・トキソプラズマの抗体検査受託												