

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。

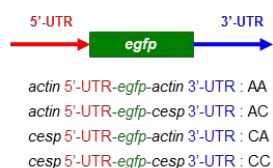


図1：異なるUTRを組合わせたeGFP発現力セット

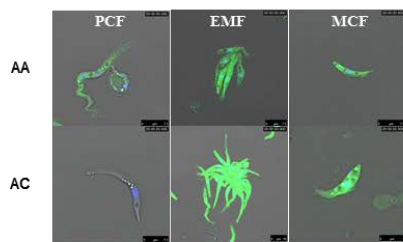


図2：図1のeGFP発現力セットを導入したトリパノソーマにおけるeGFP発現パターンの比較



図3：ザンビアでの疫学調査



図4：ザンビアの地図

○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策定を目指した研究を実施している。

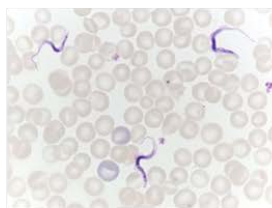


図5：ザンビアで捕獲したツェツェバエ唾液腺より分離した*T. b. rhodesiense*

○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。

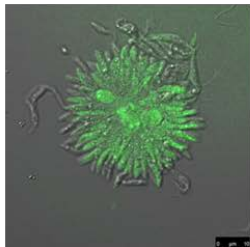


図6：培養系で増殖するEMF虫体のコロニー



図7：ツェツェバエの口吻部に寄生するEMF型虫体

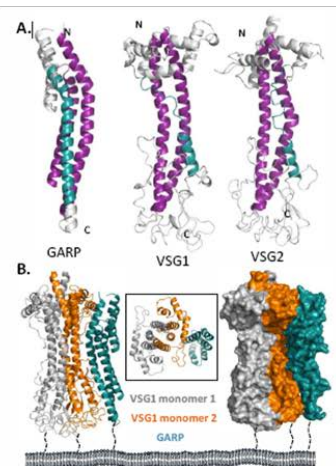
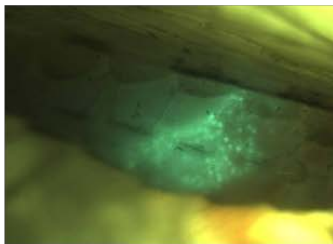


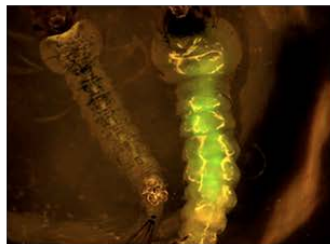
図8：国際共同研究で解明したGARPとVSGとの構造類似性。発育ステージ変化の際に脆弱な細胞膜を露出させずにVSG/GARP交換を行っている
 (Loveless et al. 2011, J. Biol. Chem. 286)

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、マラリア・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。言い換えれば、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ラリア原虫オーシスト（緑色）



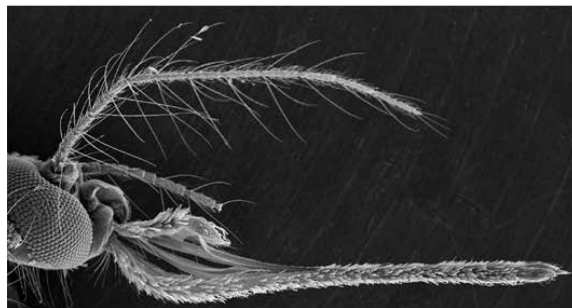
セラチア菌（緑色）を中腸に持つハマダラカ幼虫



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ワバエ（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

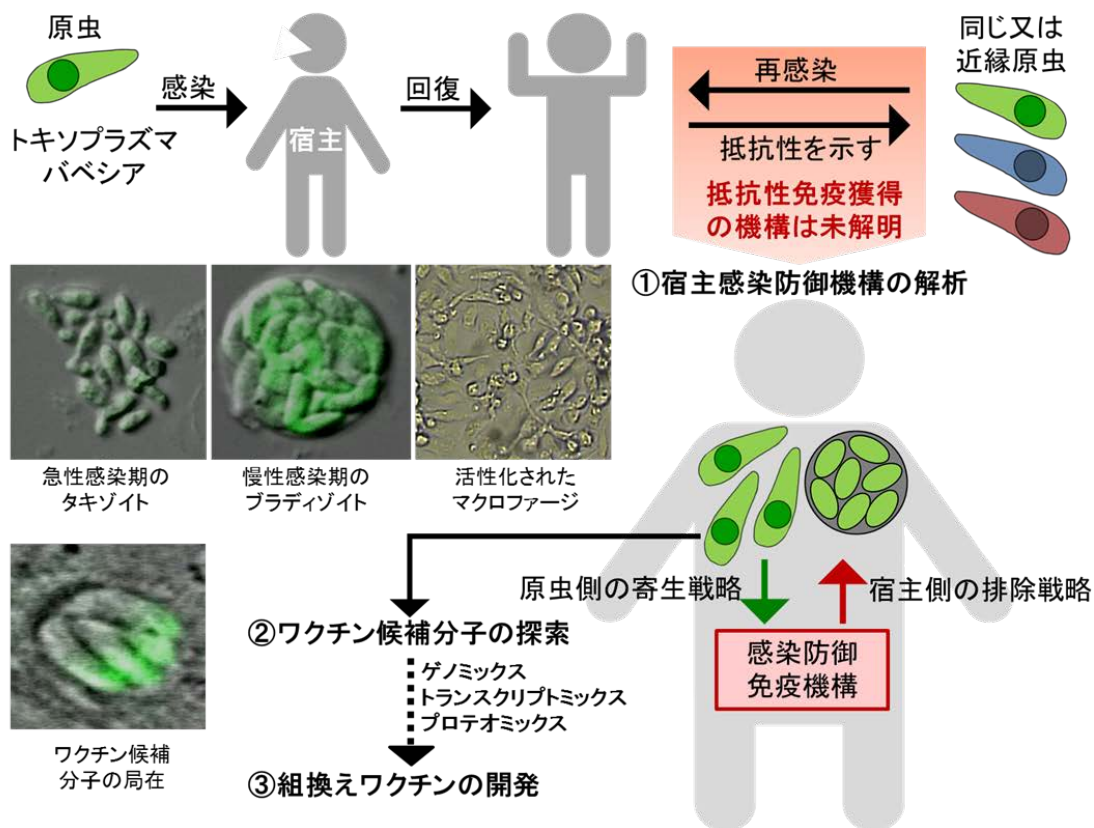
原虫感染後に回復した宿主は同じ原虫或いは近縁原虫の再感染に抵抗性を示すことが多いが、その抵抗性免疫獲得の機構はまだよく分かっていないのです。そこで、原虫側の寄生戦略と宿主側の排除戦略の両側面から抵抗性免疫獲得の仕組みの解明を目指しています。

・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

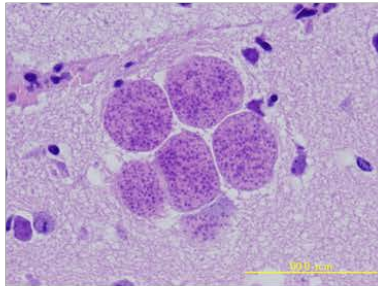
准教授 西川 義文

http://www.obihiro.ac.jp/~geneticbiochem/member/nishikawa_1.htm

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。

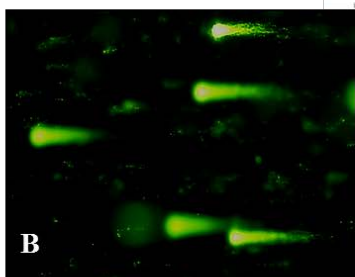
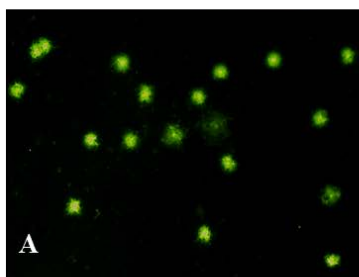
(4) 生物資源を利用した新しい創薬

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)、 α -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。



発生・生殖工学技術の盲導犬育成への応用を紹介したNature 誌（2007年3月）

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。

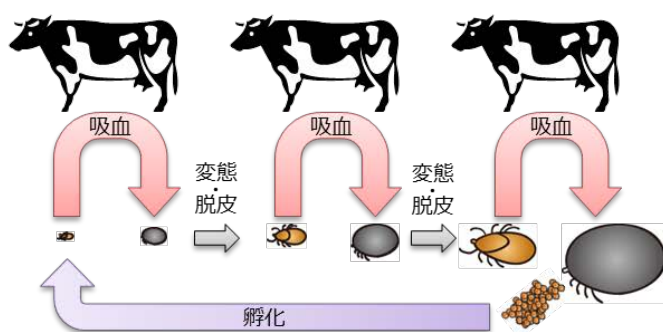


図1. マダニの生活史



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)

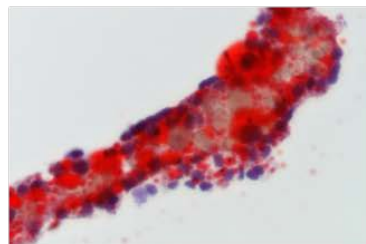


図4. 未吸血(飢餓状態)マダニの消化管(中腸)。脂質(赤色)に富んでいる。



図5. Target of rapamycin (TOR) ホモログをノックダウンしたマダニの飽血後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。

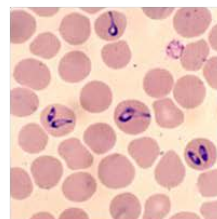
○マダニの栄養代謝に関与する分子機構の解明

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(ビテロジェニン; 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。



ウマバベシア
(*T. equi*)

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、形態学的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

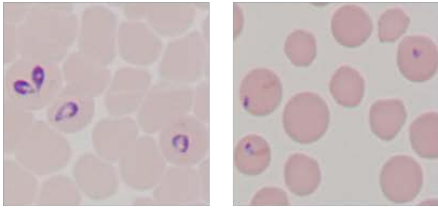
各種原虫の遺伝子解析により、診断に有効なバベシア抗原を同定し、組換え抗原を用いた簡便で迅速なELISA（酵素抗体法）やICT（イムノクロマト法）などの血清診断法、PCRやLAMPなどの遺伝子診断法を開発しています。

○OIEとの連携・世界規模の疫学調査

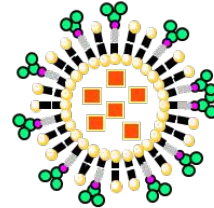
OIEのリファレンスラボラトリーとして、牛バベシア症と馬ピロプラズマ症に関する診断試薬の提供や技術的な指導・助言、インド馬研究所との馬ピロプラズマ症に関する連携プログラムにより、研究員の技術研修やセミナーなどを行っています。また、開発した診断法を用いてアジア・アフリカ・南米などにおいてバベシア症に関する世界規模での疫学的調査研究を行っています。

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。

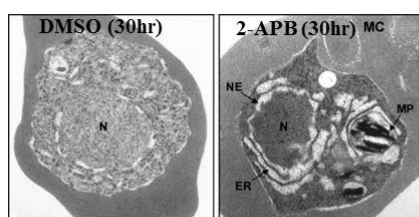


図1：IP₃R阻害剤（2-APB）によるマラリア原虫発育障害 (Enomoto M et al. 2012. PLoS ONE)

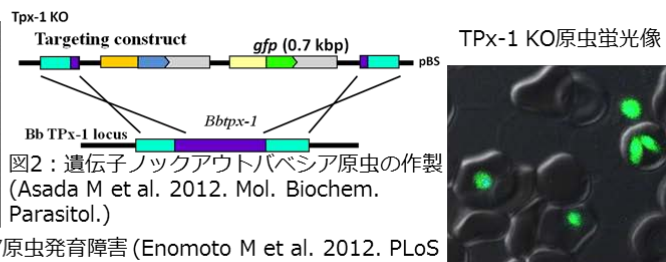


図2：遺伝子ノックアウトバベシア原虫の作製 (Asada M et al. 2012. Mol. Biochem. Parasitol.)

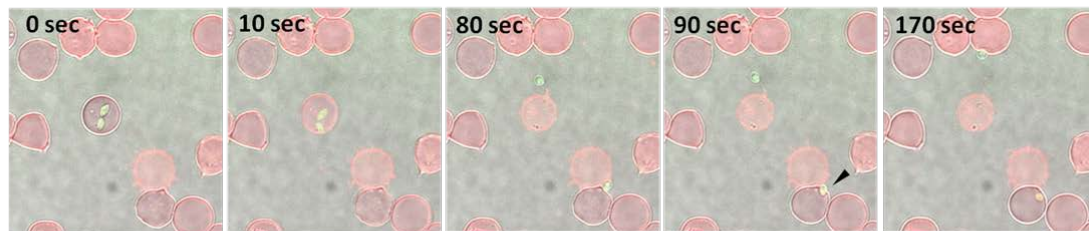


図3：GFP発現バベシア原虫が宿主赤血球より遊出し、滑走しながら新しい赤血球に侵入(矢頭)する様子 (Asada M et al. 2012. PLoS ONE)

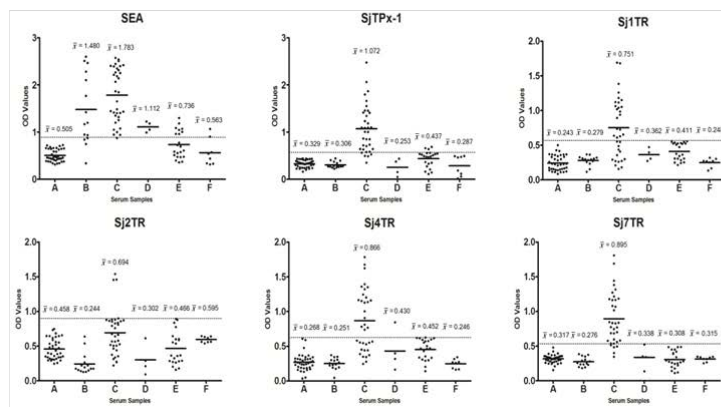


図4：虫卵粗抗原（SEA）及び組換え体抗原でのELISA。A, 非流行地の健康人血清。B, 流行地の健康人血清。C, 日本住血吸虫卵陽性者（患者）血清。D, 治療（1年）後患者血清。E, 肺吸虫症及び肝吸虫症患者血清。F, 原虫病患者血清。SjTPx-1とSj7TRの診断抗原としての有用性が示唆された。(Angeles JM et al. 2011. Am. J. Trop. Med. Hyg.)

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。

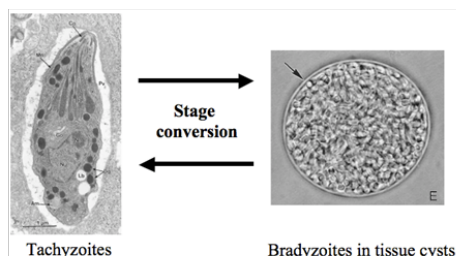


図1. トキソプラズマ原虫のステージ変換

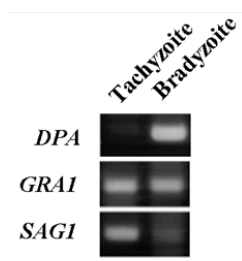


図2. ブラディゾイト特異的に発現するDPA分子の同定

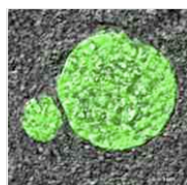
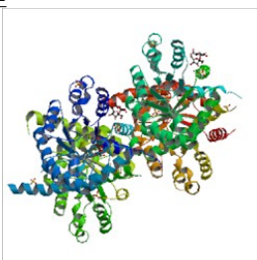


図3. DPA分子の脳内シストでの発現



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。

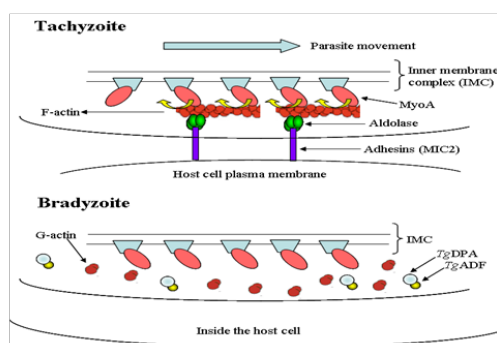
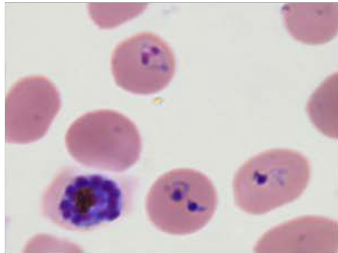


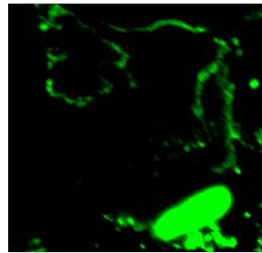
図4. 生化学的解析により、DPA分子はアクチン脱重合因子TgADFを介し、アクチンの重合・脱重合を制御することにより、ブラディゾイトの静的動態を維持していると予想された。（上野ら、Mol. Biochem. Parasitol. 193, 39-42. 2010）

地球規模感染症学分野 特任准教授 加藤 健太郎

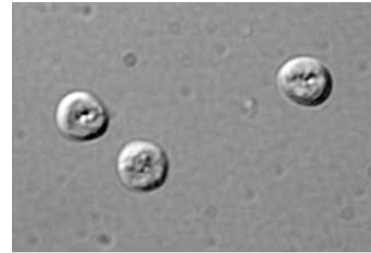
世界三大感染症の1つであるマラリア原虫（熱帯熱マラリア原虫、ローデントマラリア原虫）と人獣共通感染症として地球規模で問題となっているトキソプラズマ原虫、クリプトスポリジウム原虫を研究対象とし、「如何にして病原微生物は宿主細胞に感染し、増殖するのか」という命題について、主に分子生物学、ウイルス学の手法をもってアプローチしています。さらに、ここで得られた知見を基にした新しい抗原虫薬、原虫ワクチンの開発等の実用的な研究課題にも取り組んでいます。



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†, **Kato K† (†contributed equally.)**, Seydel KB, Gut J, Lehman J, Klembs 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 26 年度学術賞などの受賞者

年 月	受賞者名	受 賞 名	概 要
H26 年 6 月	加藤 健太郎	平成 25 年度森永奉仕会賞受賞	受賞研究テーマ「小児の健康、公衆衛生上問題となる原虫感染症の酵素解析と薬剤開発」
H26 年 9 月	林田 京子 (特任研究員)	第 157 回日本獣医学会学術集会 獣医学奨励賞受賞	受賞研究課題「タイレリア原虫の比較ゲノム解析と病原性進化に関する研究」
H26 年 9 月	杉 達紀 (JSPS 特別研究員)	第 157 回日本獣医学会学術集会 獣医学奨励賞受賞	受賞研究課題「トキソプラズマの潜伏感染および急性感染を制御するシグナル経路の解析」
H26 年 9 月	根本 誓哉 (博士前期課程 1 年)	日本身体障害者補助犬学会学会賞受賞	第 6 回日本身体障害者補助犬学会(平成 25 年 10 月)で発表した研究が評価され、日本身体障害者補助犬学会の学会賞を受賞。
H26 年 10 月	Thillaiamapalam Sivakumar (JSPS 外国人特別研究員)	スリランカ科学論文大統領賞を受賞	2014 年 10 月 31 日にコロンボでスリランカ国政府が主催した授与式に参加し、スリランカ科学論文大統領賞(President's Awards for Scientific Publication -2012)を受賞しました。本賞は、同博士の「スリランカにおける牛ピロプラズマ症の分子疫学調査に関わる研究」の成果に対してスリランカ国大統領(H. E. Mahinda Rajapaksa)より送られたものです。
H26 年 11 月	加藤 健太郎	平成 26 年度(第 10 回)「若手農林水産研究者表彰」の農林水産技術会議会長賞を受賞	業績名「食品媒介性原虫感染症に対する新規薬剤の技術開発」

③ 共同利用・共同研究課題の概要

	課 題 名	研 究 概 要
1	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	ビタミン E 結合蛋白質(α -TTP)の欠損したマウスでは血中ビタミン E が枯渇し、マラリア原虫感染症に対して耐性を獲得するという鈴木、Herbas らの知見(Am.J.Clin.Nutr. 2010;91:200-7.)と、研究代表者の高脂血症治療薬プロブコールに ABCA1 トランスポーターを不活性化することでビタミン E 血中濃度を低下する効果があるという知見(J. Nutr.Biochem 2010;21:451-6.)の融合を共同研究で試みた。プロブコールをマウスに前投与するとマラリア感染に対して顕著な抑制効果を示した。本研究計画では、マラリア感染の死亡原因として重要な脳性マラリアに対するプロブコールなどによる血中ビタミン E 減少効果の有効性を検証することを目的とした。
2	次世代シークエンサーを用いたトランスクリプトームによるトキソプラズマ由来エフェクター分子の機能解析	トキソプラズマは細胞内寄生性原虫であり、原虫由来の様々な分泌タンパク質により宿主細胞の機能を制御していることが知られている。しかしながら、トキソプラズマ特有の寄生戦略のメカニズムについては不明な点が多い。我々の共同研究により、トキソプラズマに感染させたマウスの脳組織および脳神経細胞のトランスクリプトーム解析を実施してきた。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(Tanaka et al, Infect Immun. 2013)。しかしながら、トキソプラズマのどの分子が宿主細胞の遺伝子発現を制御するのかは不明である。共同研究担当教員(西川義文)の研究グループでは、宿主制御に関与する原虫因子として、Dense Granule Protein 7 (GRA7)と cyclophilin 18 (Cyp18)を見出し (Ibrahim et al., Infect Immun. 2009; Terkawi et al., Clin Vaccine Immunol. 2013)、当該遺伝子の欠損原虫の作出に成功した。本共同研究では、これら遺伝子欠損原虫を免疫細胞や脳神経細胞へ感染させ、次世代シークエンサーを用いたトランスクリプトームにより、宿主細胞制御メカニズムを明らかにすることを目的とする。
3	トキソプラズマ潜伏感染が誘導する抗ウイルス自然免疫応答の分子基盤の解明	トキソプラズマは、ヒトを含めた多くの哺乳類に感染する人獣共通感染原虫である。同原虫は宿主体内で急性感染期のタキゾイトから潜伏感染期のブラディゾイトへとステージ変換し、休眠状態となって終生寄生する。申請者らは、ブラディゾイト潜伏感染細胞では強い抗ウイルス活性を持つ種々の自然免疫関連蛋白質遺伝子(OAS1 および ISG15 など、I 型インターフェロン(IFN)に誘導されるもの)が強く発現していることを見いだしている。本研究では、トキソプラズマ潜伏感染が宿主の抗ウイルス自然免疫応答を亢進させる分子機構と意義を明らかにする目的で、マウス宿主宿主抗ウイルス自然免疫系に作用する原虫由来分泌蛋白質の探索や、原虫感染マウスモデルへの種々のウイルス接種攻撃試験を行った。

共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
4	IMPDH を標的とした抗原虫薬の研究開発	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。本研究ではクリプトスポリジウム原虫 (<i>Cryptosporidium parvum</i> , Cp) 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、ヒトのものと大きく異なる事に注目し、組換え IMPDH を用いてミコフェノール酸 (MPA) 誘導体や天然物から CpIMPDH 特異的阻害剤を探索する。またトリパノソーマ <i>in vitro</i> 培養系に供することで、MPA 誘導体の抗原虫作用を評価する。また樹皮より抗原虫薬を探索する。
5	マダニ防除を目指した繁殖学的基礎研究	マダニ類はその突出した媒介能により多様な病原体伝播に関わることで獣医学および医学上重要と考えられている。そのうち、フタトゲチマダニは我が国の牧野における最優占種であり、牛および犬のピロプラズマ原虫をはじめ、日本紅斑熱やロシア春夏脳炎などの媒介種としてよく知られている。また、生物にとって繁殖行動は種の保存のための最重要事項であり、生物の防除を考える上でも繁殖システムの解明と、それによる制圧法の開発は有効な手段となりうる。しかしながら、マダニ類の繁殖プロセスは不明な点も多く残されている。フタトゲチマダニ両性生殖系を用いたマダニの繁殖学に関する基礎的研究に携わった経験がある申請者と発生工学に関して豊富な知識や経験を持つ原虫病研究センターのゲノム機能学分野および感染免疫研究部門との共同研究によって、マダニ繁殖学の進展とそれを利用したマダニ防除法の開発に貢献することを目指す。
6	組換えフェリチンを用いた抗マダニワクチンの開発	マダニ体内は吸血する際に血液に含まれる大量の鉄分子に暴露されることが予想される。鉄分子はマダニの生命恒常維持において不可欠であるが、時には鉄分子の過剰摂取はマダニにとって有毒になることも考えられる。研究代表者らはフタトゲチマダニが 2 種類の鉄結合性タンパク質である細胞内型フェリチン 1 と分泌型フェリチン 2 を持ち、これらが吸血や産卵、鉄分子由来の酸化ストレスに対して重要な役割を担っていることを見出した。そこで研究代表者らは、大腸菌で発現させた組換えフェリチンをウサギに免疫することによって、マダニフェリチンを標的とした抗マダニワクチンとしての可能性を検討することを本共同研究の主要目的とした。
7	バベシア感染に伴う抗赤血球抗体の産生とその機能	申請者らは、マウスバベシアのひとつである <i>B. rodhaini</i> を C57BL マウスに感染させることで、1-2 週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[Chiou et al., 2012. Exp. Parasitol.]. 本研究ではこのマウスモデルを用い、バベシア感染に伴う貧血のうち、誘導された自己抗体を介しておこる赤血球破壊がどの程度関与しているのか明らかにすることをめざす。また、同様の現象が犬のバベシア (<i>B. gibsoni</i>) 感染においても起こりうるのかどうか推測する。犬を用いた動物実験は短期間では難しいため、1 年間の研究期間においては、すでに確保している感染犬血清の分析を中心に行う。

共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
8	マラリア原虫ゲノムに対する抗マラリア薬の変異原性リスク評価	マラリア治療においては薬剤耐性原虫の出現が問題となっている。その薬剤耐性は原虫のゲノム変異によると考えられており、突然変異生成機構の解明が薬剤耐性原虫の出現抑止へとつながると期待される。一部の抗マラリア薬では大腸菌等での変異原性が微弱ながらも報告されており、抗マラリア薬の投与自体が条件次第では耐性原虫の出現に関与するのではないかと仮説を立てるに至った。突然変異が生じる際、多くの場合 DNA 損傷が前提となることから、本研究においては、抗マラリア薬への暴露によりマラリア原虫ゲノムに DNA 損傷が生じるか否かをコメントアッセイにより検討を行った。
9	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。
10	原虫の宿主細胞侵入機構の構造生物学的理解と抗原虫薬の開発	宿主侵入時の初期段階において、原虫は複数の表在タンパク質を使って宿主細胞の標的因子に結合することが知られている。この表在タンパク質と宿主細胞因子の相互作用に関する理解が深まれば、原虫の宿主侵入を抑制する薬剤等の開発に大きく貢献する。本研究は、トキソプラズマ原虫の宿主細胞への侵入初期において重要な表在タンパク質に着目し、それらが宿主細胞因子に結合するための作用機序を構造生物学的アプローチにより解明することを目的とする。
11	イヌバベシア原虫のトランスクリプトーム解析	<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。前年度の原虫病研究センター共同研究では、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に、 <i>B. gibsoni</i> の全ゲノムドラフト配列を明らかにしている。本研究では、このドラフトゲノム配列を参照配列としてトランスクリプトーム解析を行うことで、転写領域の特定および発現遺伝子のカタログ化、さらにタンパク質コード領域の修正を行った。
12	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 $[Ca^{2+}]$ を利用していることが知られている。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 $[Ca^{2+}]$ の役割はほとんど明らかとなっていない。本研究では申請者らが開発したウシのバベシア原虫 <i>B. bovis</i> における遺伝子改変技術を応用し、バベシア原虫の宿主赤血球への遊出・滑走・侵入における $[Ca^{2+}]$ の役割を明らかにすることを目的としている。

共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
13	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 熱帯病研究センター(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alaria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alaria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。一方、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alaria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alaria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alaria、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alaria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。H26 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(イヌ)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。
14	Identification of novel therapeutics for babesiosis	Human babesiosis caused by the hemoprotozoan parasite <i>Babesia microti</i> is an emerging infectious disease in the United States. Young and healthy individuals typically experience an asymptomatic infection or a mild illness whereas immunocompromised patients suffer from severe illness. Despite antimicrobial therapy, nearly half of hospitalized patients develop at least one complication, and about a tenth die. Among immunocompromised patients, the fatality rate is higher (20%). The objective of this application is to identify novel compounds that are effective against severe <i>B. microti</i> infection. We propose to screen compounds currently under consideration in the fight against malaria, and made available by the Malaria Medicine Venture, in a first step, as <i>B. microti</i> cannot be grown <i>in vitro</i> , we will seek to identify compounds or combinations of thereof that prevent <i>in vitro</i> growth of <i>B. bovis</i> , a species that infects cattle. In a second step, we will screen the <i>in vitro</i> hits for their ability to prevent <i>B. microti</i> parasitemia in DBA/2 mice. We are confident that this pilot study will yield a solid framework for larger collaborative studies in the hope of expanding our therapeutic arsenal against severe babesiosis.

④共同研究成果報告会

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究成果報告会プログラム

日時:平成 27 年 1 月 30 日(金)10:00~12:00

場所:帯広畜産大学原虫病研究センターPK ホール

1. 開会挨拶

帯広畜産大学原虫病研究センター長 井上 昇

2. 共同研究成果発表(発表 20 分, 質疑応答 5~10 分)

「イヌバベシア原虫のトランスクリプトーム解析」

北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 准教授 山岸 潤也 氏

(座長:教授 玄 学南(原虫病研究センター生体防御学分野))

「新規抗原虫薬開発研究の立ち上げ」

北海道大学大学院農学研究院 特任講師 三橋 進也 氏

(座長:准教授 五十嵐 慎(原虫病研究センター感染病理学分野))

「日本各地におけるクリプトスポリジウム症の疫学調査」

岩手大学農学部共同獣医学科 助教 関(市川) まどか 氏

(座長:准教授 西川 義文(原虫病研究センター生体防御学分野))

「バベシア原虫の赤血球内増殖機構に関する研究:宿主赤血球からの遊出機構の解析」

長崎大学熱帯医学研究所 助教 麻田 正仁 氏

(座長:教授 河津 信一郎(原虫病研究センター先端予防治療学分野))

3. 閉会挨拶

独立行政法人 国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部長

帯広畜産大学原虫病研究センター運営委員長 狩野 繁之 氏

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	関係教員
H26 年 4 月	トキソプラズマ症は、病原原虫のトキソプラズマ原虫に対するワクチンや特効薬が存在しないため、原虫特異的な薬剤の開発が求められている。「こぶつきキナーゼ阻害剤」は影響を受けるプロテインキナーゼが哺乳類ゲノムに非常に少なく、特異性高くトキソプラズマ原虫の増殖を抑える新しいトキソプラズマ薬として期待されている。しかしながら、この薬剤候補分子に対しての原虫による耐性獲得がどのような仕組みで起こるのかはよく分かっていなかった。今回、無作為変異で作出した薬剤耐性株を解析することによって、予想外の位置のアミノ酸による変異によって薬剤耐性が獲得されることが明らかになった。	この知見を利用して耐性の獲得されにくい薬剤の開発につながることを期待される。	加藤健太郎
H26 年 4 月	マラリア原虫およびトキソプラズマの感染に有効な新規サブユニットワクチンを開発した。オリゴ糖リポソームに原虫由来ワクチン抗原を封入したワクチンで、マウスを用いた感染実験において防御免疫ができることを確認した。	今後、世界初の原虫病用サブユニットワクチンへの応用展開が期待される。本研究成果は新聞各紙に掲載された。	西川義文
H26 年 8 月	家畜伝染病予防法で法定伝染病に指定されているウシのバベシア病病原体の全長 EST 解析を実施し、全ゲノム情報と比較することで網羅的な遺伝子同定を行い、各遺伝子のプロモーターを予測するモデルを確立した。	診断用抗原遺伝子やワクチン抗原の網羅的検索への応用が期待できる。	玄学南、 五十嵐郁男

主な研究成果の概要・続き

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	関係教員
H26 年 12 月	我が国や世界の畜産業に大きな被害を与え続けている牛の原虫性下痢症(クリプトスポリジウム症)の国内における疫学調査を実施し、遺伝子型を明らかにした。	我が国の畜産(特に牛)で子牛の育成阻害要因として深刻な問題となっている原虫性下痢症の現状把握と、発生メカニズム解明に有用な疫学的情報として意義のある成果である。	横山直明、 鈴木宏志、 西川義文
H26 年 12 月	当センターの研究資源であるフタゲチマダニが、殺虫剤や忌避剤などのマダニに対する効力を検証する試験に活用された。	既存の殺虫剤や忌避剤のマダニに対する効力が明らかになり、各薬剤の適用害虫にマダニが追加され、一般社会に広く発信された。今後、新たな殺虫剤や忌避剤の開発にも貢献できると期待される。	白藤梨可

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	20	6	3	5	3	4	2	5	3	1	0	2	54
PRCD-PRA遺伝子検査	3	1	3	5	13	7	0	4	6	1	0	3	46
馬ピロプラズマ症確定診断	2	1	2	1	1	0	0	0	1	3	3	0	14
ネオスポラ抗体検査	0	107	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	110
マダニからの小型ピロプラズマの検査	0	0	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	500
放牧牛からの小型ピロプラズマの検査	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100
その他	6月 マラリア診断補助 血液薄層塗抹観察、RTDテスト、PCR												