

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。

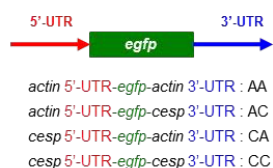


図1：異なるUTRを組合わせたeGFP発現力セット

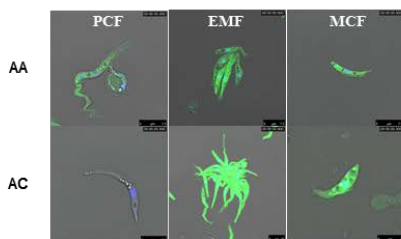


図2：図1のeGFP発現力セットを導入したトリパノソーマにおけるeGFP発現パターンの比較



図3：ザンビアでの疫学調査



図4：ザンビアの地図

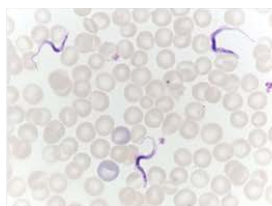


図5：ザンビアで捕獲したツェツェバエ唾液腺より分離した *T. b. rhodesiense*

○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策定を目指した研究を実施している。

○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。

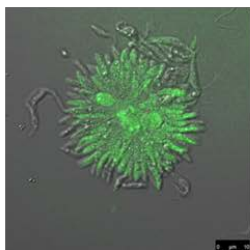


図6：培養系で増殖するEMF虫体のコロニー



図7：ツェツェバエの口吻部に寄生するEMF型虫体

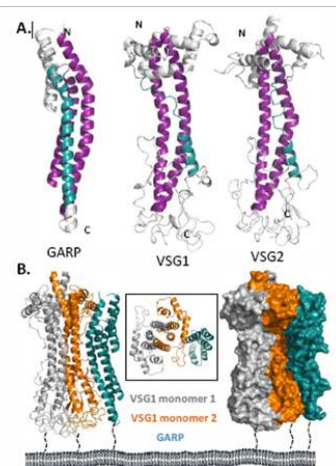
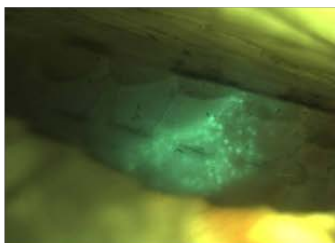


図8：国際共同研究で解明したGARPとVSGとの構造類似性。発育ステージ変化の際に脆弱な細胞膜を露出させずにVSG/GARP交換を行っている (Loveless et al. 2011, J. Biol. Chem. 286)

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）



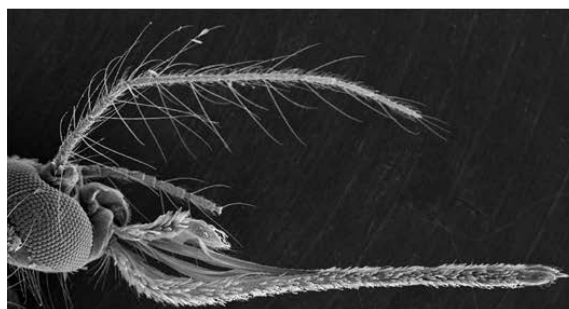
セラチア菌（緑色）を中腸に持つハマダラカ幼虫



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

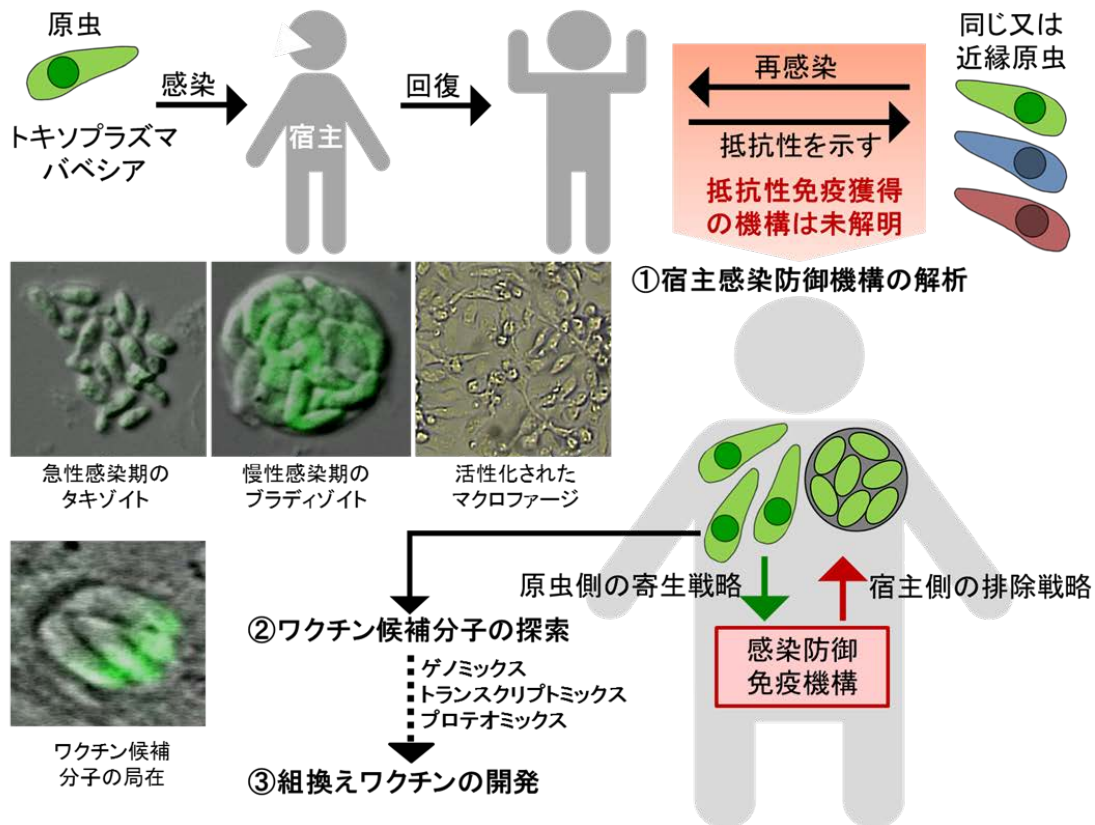
原虫感染後に回復した宿主は同じ原虫或いは近縁原虫の再感染に抵抗性を示すことが多いが、その抵抗性免疫獲得の機構はまだよく分かっていないのです。そこで、原虫側の寄生戦略と宿主側の排除戦略の両側面から抵抗性免疫獲得の仕組みの解明を目指しています。

・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

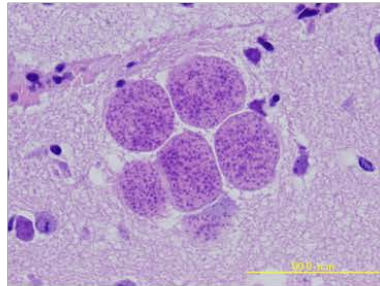
准教授 西川 義文

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。

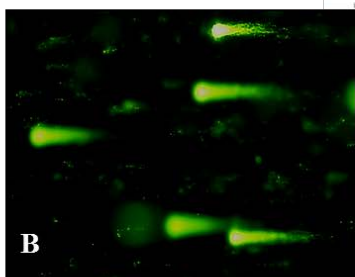
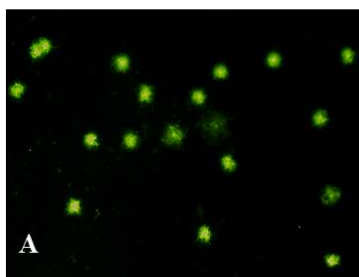
(4) 生物資源を利用した新しい創薬

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。

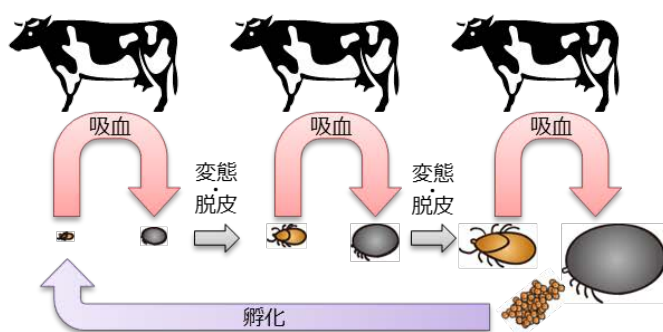


図1. マダニの生活史



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)

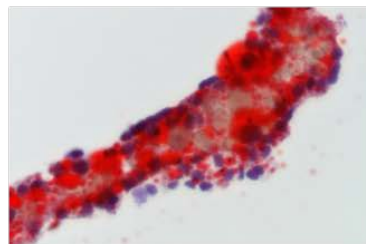


図4. 未吸血(飢餓状態)マダニの消化管(中腸)。脂質(赤色)に富んでいる。



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。

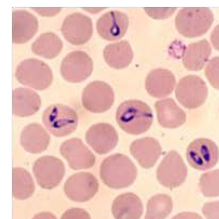
○マダニの栄養代謝に関与する分子機構の解明

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

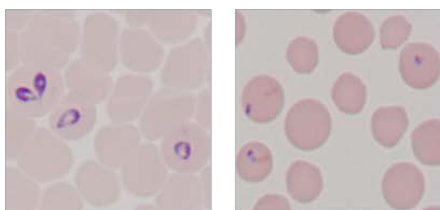
各種原虫の遺伝子解析により、診断に有効なバベシア抗原を同定し、組換え抗原を用いた簡便で迅速なELISA（酵素抗体法）やICT（イムノクロマト法）などの血清診断法、PCRやLAMPなどの遺伝子診断法を開発しています。

○OIEとの連携・世界規模の疫学調査

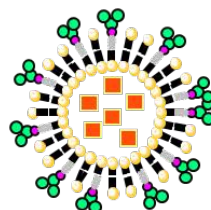
OIEのリファレンスラボラトリーとして、牛バベシア症と馬ピロプラズマ症に関する診断試薬の提供や技術的な指導・助言、インド馬研究所との馬ピロプラズマ症に関する連携プログラムにより、研究員の技術研修やセミナーなどを行っています。また、開発した診断法を用いてアジア・アフリカ・南米などにおいてバベシア症に関する世界規模での疫学的調査研究を行っています。

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てます。

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。

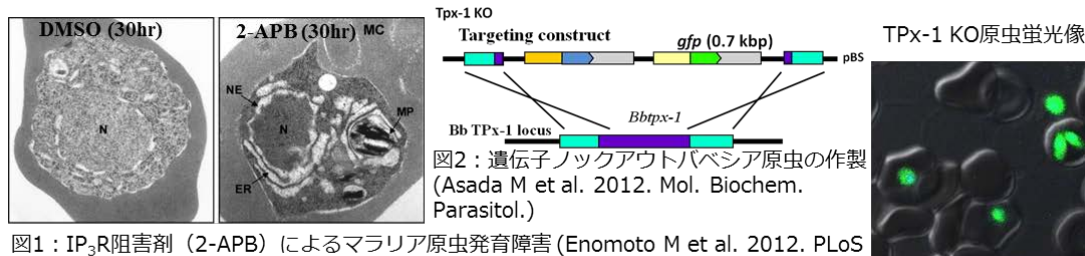


図1：IP₃R阻害剤 (2-APB) によるマラリア原虫発育障害 (Enomoto M et al. 2012. PLoS ONE)

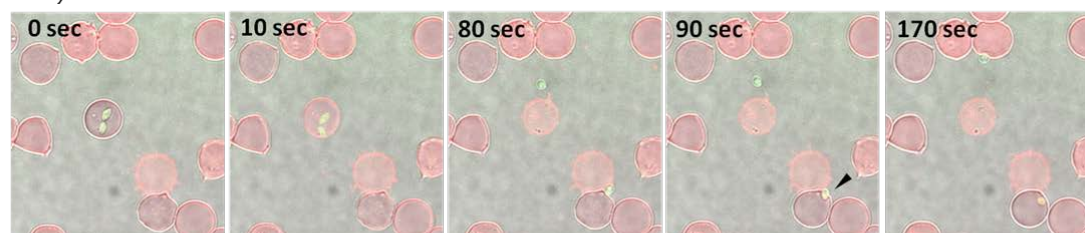


図3：GFP発現バベシア原虫が宿主赤血球より遊出し、滑走しながら新しい赤血球に侵入(矢頭)する様子 (Asada M et al. 2012. PLoS ONE)

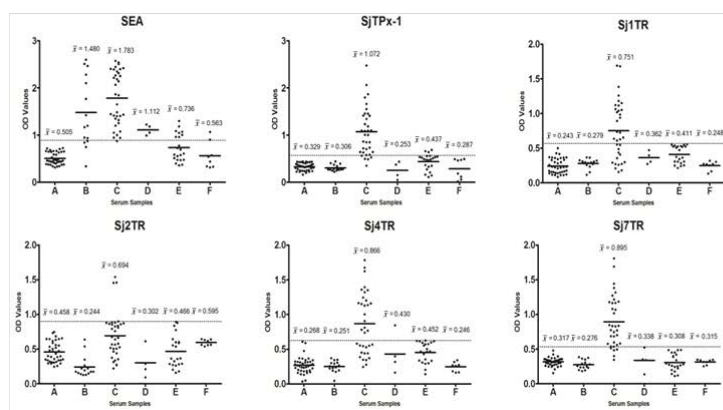


図4：虫卵粗抗原 (SEA) 及び組換え体抗原でのELISA. A, 非流行地の健康人血清. B, 流行地の健康人血清. C, 日本住血吸虫卵陽性者 (患者) 血清. D, 治療 (1 年) 後患者血清. E, 肺吸虫症及び肝吸虫症患者血清. F, 原虫病患者血清. SjTPx-1 と Sj7TR の診断抗原としての有用性が示唆された. (Angeles JM et al. 2011. Am. J. Trop. Med. Hyg.)

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、H I V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。

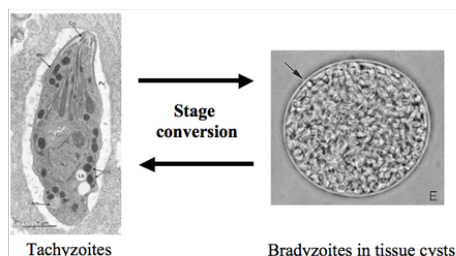


図1. トキソプラズマ原虫のステージ変換

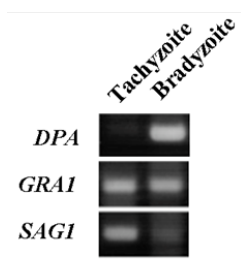


図2. ブラディゾイト特異的に発現するDPA分子の同定

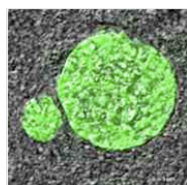
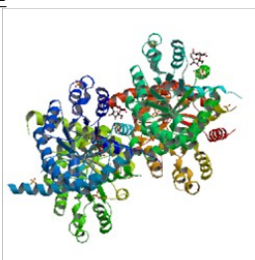


図3. DPA分子の脳内シストでの発現



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。

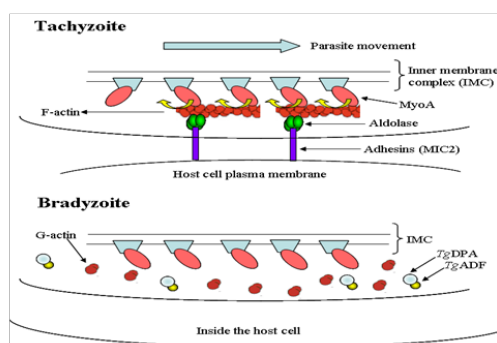
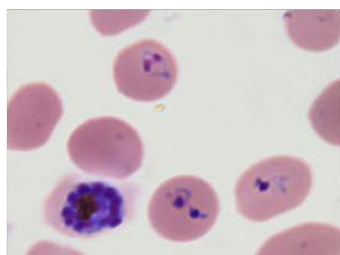


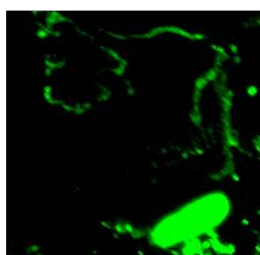
図4. 生化学的解析により、DPA分子はアクチン脱重合因子TgADFを介し、アクチンの重合・脱重合を制御することにより、ブラディゾイトの静的動態を維持していると予想された。（上野ら、Mol. Biochem. Parasitol. 193, 39-42. 2010）

地球規模感染症学分野 特任准教授 加藤 健太郎

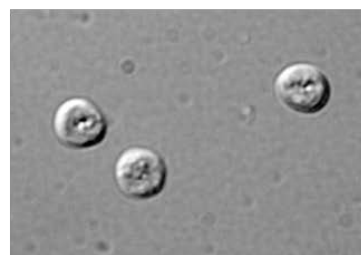
世界三大感染症の1つであるマラリア原虫（熱帯熱マラリア原虫、ローデントマラリア原虫）と人獣共通感染症として地球規模で問題となっているトキソプラズマ原虫、クリプトスポリジウム原虫を研究対象とし、「如何にして病原微生物は宿主細胞に感染し、増殖するのか」という命題について、主に分子生物学、ウイルス学の手法をもってアプローチしています。さらに、ここで得られた知見を基にした新しい抗原虫薬、原虫ワクチンの開発等の実用的な研究課題にも取り組んでいます。



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
(Sugi T et al. *Eukaryot Cell*. 9:667-670.)



クリプトスポリジウム原虫のオーシスト

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 27 年度学術賞などの受賞者

年 月	受賞者名	受 賞 名	概 要
H27 年 9 月	村越 ふみ (特任研究員)	第 6 回 獣医寄生虫学奨励賞	受賞研究テーマ「原虫共生ウイルス配列を用いた本邦におけるクリプトスポリジウム感染地推定」

③ 共同利用・共同研究課題の概要

	課 題 名	研 究 概 要
1	天然有機化合物ならびに合成化合物からの新規抗原虫薬の探索	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、原虫独特の生理機構の解明と、優れた抗原虫薬の開発が求められる。本研究では、樹木樹皮抽出物、既存薬、そして東京大学並びに北海道大学の化合物ライブラリーを用いて、トキソプラズマ原虫、クリプトスポリジウム原虫、トリパノソーマ原虫に対する抗原虫活性化化合物を探索し、得られた化合物をリードとして誘導体を合成し、新規抗原虫薬開発へと繋げる。またこれまでの研究で見出された抗トリパノソーマ化合物 5-hydroxy-mycophenolic acid を動物への感染実験に供し効果を調べる。
2	クリプトスポリジウム症に対する初乳中の抗体による予防効果の検討	<i>Cryptosporidium parvum</i> は新生子牛の下痢症の原因として最も重要であり、畜産業に甚大な経済被害を与えている。獣医臨床現場では、十分な初乳の給与が発症の予防に有効であることが経験的に知られてきたが、それを支持する科学的根拠は明確でない。そこで本研究では、初乳中の <i>C. parvum</i> 抗体価とクリプトスポリジウム症の発症率および症状との相関を解析することで、初乳中の抗体による予防効果の有無を明らかにする。
3	バベシア原虫メロゾイトの宿主赤血球遊出機構の解析	バベシア原虫はアピコンプレクサ門に属し、家畜に多大な経済的損失を与える住血原虫である。我々はこれまでの共同研究「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」から、バベシア原虫メロゾイトの宿主赤血球からの遊出が原虫細胞内カルシウムイオン濃度[Ca ²⁺]依存症であることを初めて見出した。しかし、[Ca ²⁺]上昇以降から原虫の遊出までの分子機構については、その詳細はまだ明らかとなっていない。そこで本研究ではメロゾイト遊出の分子機構について、特に Ca ²⁺ と関連して詳細に解析することを目的とした。
4	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のビタミン E が枯渇し、マラリア原虫感染症に対して耐性があることを鈴木、Herbas らが報告している (Am.J.Clin.Nutr. 2010;91:200-7.)。一方、研究代表者は、高脂血症治療薬であるプロブコールは ABCA1 トランスポーターを不活性化することで、肝細胞からのビタミン E 放出を抑えることを明らかにし、実際にプロブコールをマウスに投与すると血中ビタミン E 濃度を減少させる効果があることを報告している (J. Nutr.Biochem 2010;21:451-6.)。以上の研究成果を融合し、プロブコールをマウスに投与した場合、マラリア感染に対して顕著な抑制効果を示した。しかしながら、プロブコールの使用量が多いこと、コレステロールなどの脂質も減少することが問題であった。そこで 27 年度は、ビタミン E 減少効果を有し、マラリア感染に対して有用な薬剤の探索を行うこととした。

共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
5	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	申請者らは北里大学北里生命科学研究所(以下、北里大)が保有する天然物ライブラリーから <i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> で有効な抗マラリアおよび抗トリパノソーマ原虫活性物質を見出し、抗原虫活性物質ライブラリーを構築している。これらの抗原虫活性物質はマラリアおよびアフリカトリパノソーマ原虫と同じ住血原虫類であるバベシアに対しても抗原虫活性を示す可能性が考えられ、北里大の保有する抗原虫活性物質ライブラリーの中からバベシア治療薬のシード化合物を見出すことを目的に帯広畜産大・五十嵐先生との共同研究を本助成により継続して来た。その結果、今年度までに幾つかの化合物が <i>in vitro</i> 抗バベシア活性を示すことを見出し、有望な化合物については <i>in vivo</i> マウス実験系で検証してきた。その成果として、clofazimine (以下、CLF) の抗バベシア活性について帯広畜産大と北里大で用途特許を共同出願、さらに JST 支援のもと PCT 出願に至った。次年度は(1)北里大の保有する抗原虫活性物質ライブラリーを用いた抗バベシア活性物質のスクリーニングを継続するとともに、(2)特許を出願した化合物 (CLF) についてコンパニオンアニマルを対象とした製剤化に向けてイヌバベシアで有用性および安全性の検討を実施する。相乗相加効果を目的とし、他剤との併用実験も検討する。
6	抗原虫薬開発に適した化合物ライブラリーと評価システムの構築	多くの原虫病薬はその市場規模が新規抗原虫薬開発費を下回る為、大手製薬企業の関心は低い。従って、利潤に左右されない研究機関で抗原虫薬探索を実施していくことが重要である。本研究の目的は、「妊娠期の原虫感染(トキソプラズマ、ネオスポラ)による繁殖障害問題を解決する」ための創薬につながる新規技術・有用化合物を提供することにある。我々は、これまでに蛍光タンパク質発現原虫を用いて抗原虫薬を簡便に判別する基盤技術、放射菌由来の天然化合物を利用した化合物ライブラリーの開発を行ってきた。本研究では、本スクリーニング系を用いて微生物化学研究所で採取した天然化合物から新たな抗原虫薬候補の探索および抗原虫薬開発に適した化合物ライブラリーの構築を行う。さらに、抗原虫活性を示した化合物の作用機序解析を行う。本研究課題の成果により、有効な治療法や予防法が存在しない当該感染症対策に大きく貢献できる。
7	ヒツジバベシア原虫 <i>Babesia ovis</i> のゲノム解析	<i>Babesia ovis</i> が引き起こすヒツジバベシア症は、発熱、溶血性貧血、ヘモグロビン尿症、黄疸等の症状を引き起こし、養羊業に多大な経済的被害をもたらす。その分布域は、ベクターである <i>Rhipicephalus</i> 属のマダニが生息する熱帯・亜熱帯のヨーロッパ、アフリカ、アジアと広大である。トルコにおいても当該疾病の被害は甚大であり、抗体陽性率は 32-80%、原虫検出率も 2.6-8.25%と非常に高い。これまで申請者は、 <i>B. gibsoni</i> や <i>B. ovata</i> 等、各種原虫病における、診断、薬剤標的、薬剤耐性出現メカニズム、ワクチン開発の基盤となるゲノム情報の収集・解析・公開を継続的に行ってきた。そこで今回、トルコをはじめ、世界的に問題となっている <i>B. ovis</i> に着目し、その全ゲノムを明らかにすることにより、問題解決に資する情報基盤の提供を試みる。

共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
8	多数かつ大型のシスト形成能を有するトキソプラズマ株：K-3株の基本性状解明	K-3 株は、1970 年代に東京都多摩地区の野良猫より分離されたトキソプラズマ株であり(松井ら、杏林医学会誌、1986)、これまでマウスで継代されてきた。本株はマウス脳において多数かつ大型のシストを形成することが知られており、半年以上の長期間感染によって特異的な神経症状(頭頸部の搔痒)をマウスにもたらす事がある(未発表)。しかし、病原性などその他の性状については不明な点が多い。そこで本研究では、K-3 株の基本的性状を理解することを目的とし、実験動物を用いて本株の宿主体内動態、病原性及びシスト形成の系時的解析を行う。
9	クリプトスポリジウムタンパク質の立体構造解析	これまでに立体構造解析がなされていないクリプトスポリジウム原虫の表面に発現するタンパク質を中心に構造解析を行う。この構造情報を利用し、ワクチン候補抗原の探索や接着阻害剤の探索を最終目的とする。
10	Molecular pathogenesis of inflammasome and carcinogenesis induced by <i>T. vaginalis</i> on human normal prostate epithelial cell (PZ-HPV-7)	Chronic inflammation has been shown to contribute to the development of several human cancers. Recently, scientists have begun to consider inflammation in the etiology of prostate cancer (PC) due to intensive inflammatory infiltrates near early lesions putatively induced by prostate cancer. PC is the second most incident cancer and ranking of the 6th death cause among various cancers in men world and it has also been associated with sexually transmitted diseases (STDs) significantly. <i>Trichomonas vaginalis</i>, a flagellate protozoan, is the most common non-viral STDs worldwide, with an estimated 174 million new cases per year, of which 154 million occur in resource-limited settings. <i>T. vaginalis</i> has been observed in prostate tissue near inflammation areas admixed epithelial hyperplasia, suggesting that this parasite might be involved in prostate carcinogenesis. RNA-seq has become a common technique in the detection of transcriptome. It is a sequencing technique with high-throughput ability to sequence cDNA library which is transcribed from all RNAs in tissues or cells, and can be used to quantify or discover RNA transcripts by sequence reads. It has been widely used in biological, medical, clinical and pharmaceutical research. We intend to undertake RNA-seq analysis of inflammatory and carcinogenic mechanism induced by <i>T. vaginalis</i> on human normal prostate epithelial cell (PZ-HPV-7). PZ-HPV-7 is an <i>in vitro</i> model of carcinogenesis of the prostate induced by <i>T. vaginalis</i> infection. We will also use Real-Time PCR to confirm the quantity and importance of PZ-HPV-7 and <i>T. vaginalis</i> Unigene which participate in the pathway of Prostate Cancer. RNA interference (RNAi) will be used to transfect PZ-HPV-7 and <i>T. vaginalis</i>, thereafter mRNA expression of inflammatory factors (IL-1β, CCL2 and CXCL8) and carcinogenic genes (GSTP1, NKX3.1, PTEN and AR) will be assessed to further insight into molecular mechanisms of RNA levels of inflammatory and carcinogenic factors. In addition, a comparison in pathogenicity will be made between <i>T. vaginalis</i> obtained from Taiwanese patients and the other <i>T. vaginalis</i> from different geographic districts in the world.

共同利用・共同研究課題の概要・続き

	課 題 名	研 究 概 要
		These results may not only provide advanced information concerning RNA levels on how <i>T. vaginalis</i> is involved in regulation to induce inflammatory and carcinogenic developments in PZ-HPV-7, but also the molecular mechanism of RNA level regulation between host and parasite will be disclosed. This study may link the RNA level between <i>T. vaginalis</i> infection and prostate carcinogenesis and it will be beneficial to design new strategies and drugs to defeat prostate carcinogenesis induced by <i>T. vaginalis</i> infection.
11	マダニの吸血および産卵におけるペルオキシレドキシンの役割について	活性酵素の一つである過酸化水素は、生体に対して酸化ストレスを引き起こす。マダニは編成吸血性節足動物で、最小単位の遊離鉄を含む脊椎動物血液のみを摂取するため、この遊離鉄と酸素の反応により過酸化水素が産生され、マダニは吸血により大量の過酸化水素にさらされることが予想される。マダニにおいては過酸化水素の制御が重要と考え、過酸化水素消去分子であるペルオキシレドキシンに着目した。これまでに申請者らは、フタトゲチマダニの2-Cys型ペルオキシレドキシン(HIPrx2)が、吸血に伴い発現が上昇し、臓器別では卵巣での発現が顕著であった。そこで申請者らは、RNA 干渉法を用いて、HIPrx2 遺伝子ノックダウンマダニを作出し、HIPrx2 がマダニの吸血や産卵に及ぼす影響について解析を行うことを本共同研究の主要目的とした。
12	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	ヘパリン等の硫酸化多糖類は、マラリア原虫メロゾイトの表在タンパク質に結合することにより、マラリア原虫に対して強力な侵入阻害を引き起こす。本研究では、X 線結晶構造解析により、この表在タンパク質に対して、赤血球表面分子または硫酸化多糖類が結合した状態の立体構造を明らかにし、マラリア原虫の宿主侵入時における表在タンパク質の赤血球標的機構と硫酸化多糖類の作用機序を解明する。また、トキソプラズマ原虫の宿主細胞侵入時に中心的な役割を果たすTgRON4と宿主細胞の足場であるβチューブリンとの複合体構造を解析し、侵入初期における宿主細胞因子への標的機構を解明する。
13	マダニ防除を目的としたフタトゲチマダニにおける繁殖学的基礎研究	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もよく知られており、公衆衛生学上も重要なリケッチア・ウイルス媒介種である。一方、生物にとって繁殖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その解明はその制圧法の開発に導く有効なアプローチとなりうる。しかしながら、マダニ類の繁殖プロセスは、当然ながら哺乳類とは大きく異なり、不明な点も多く残されている。そこで、まずマダニ類の繁殖機構の解明を第一の目的として昨年度から開始している基礎研究を進めると共に、その成果に基づく防除法の開発を目指す。

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 28 年 1 月 28 日(木)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)

「マラリア原虫感染症に対する血中ビタミン E 濃度に影響する薬物の効果に関する研究」

国立研究開発法人産業技術総合研究所健康工学研究部門ストレスシグナル研究グループ 主任研究員 七里 元督 氏

(座長:教授 鈴木 宏志(原虫病研究センターゲノム機能学分野))

「トキソプラズマ原虫の宿主細胞侵入機構の構造生物学的解析」

東京大学大学院農学生命科学研究科 助教 宮川 拓也 氏

(座長:特任准教授 加藤 健太郎(原虫病研究センター地球規模感染症学分野))

3. 閉会挨拶

帯広畜産大学原虫病研究センター長 井上 昇

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
H27 年 7 月	東京大学大学院農学生命科学研究科の加藤健太郎准教授(帯広畜産大学 原虫病研究センター 特任准教授兼任)らの研究グループは、ヘパリンという硫酸化多糖の一種がクリプトスポリジウム原虫の感染を抑制することを発見した。更に、哺乳類細胞表面の硫酸化多糖であるヘパラン硫酸がクリプトスポリジウム原虫の感染に関与していることを明らかにした。	ヘパリンやヘパラン硫酸と、クリプトスポリジウム原虫との相互作用をさらに解明することで、クリプトスポリジウムの感染機構の解明と新規薬剤の開発につながると期待される。	加藤健太郎
H27 年 7 月	インドネシア・ジャワ島西部の家畜(ウシ、ブタ)を対象に、トキソプラズマ感染に関する調査を行いました。トキソプラズマ抗体陽性の割合は、ウシで 7.4%、ブタで 14.6%でした。インドネシアにおけるヒトのトキソプラズマ感染率は 50%を超えており、食肉あるいは環境からの感染が推測されます。	本研究結果は、インドネシア・ジャワ島の都市スバンにある 家畜疾病診断センター(Disease Investigation Center Subang)との共同研究の成果です。また本論文発表は、平成 26 年度基盤研究(B)(海外学術調査)(文部科学省)(26304037)の研究成果です。	五十嵐郁男 西川義文
H27 年 8 月	海洋生物「クロナマコ」から抗酸化作用を有する物質としてリゾリン脂質を同定しました。クロナマコは歴史的に健康食品として食されてきており、今回同定したリゾリン脂質の関与が示唆されます。	本結果は、平成 20 年度グローバルCOEプログラム「アニマル・グローバル・ヘルス」の研究成果です。	西川義文
H27 年 11 月	トキソプラズマ感染マウスの慢性感染モデルを使用して、免疫抑制状態になると「うつ様症状」が発症することを明らかにしました。この「うつ様症状」の発症には、脳組織中の炎症性サイトカイン(インターフェロンガンマ)の産生、インドールアミン酸素添加酵素(Indoleamine 2,3-dioxygenase: IDO)の活性化によるキヌレニンの産生が関与していることが示唆されました。	本論文発表は、最先端・次世代研究開発支援プログラム(日本学術振興会, 2011/LS003)と平成 27 年度 挑戦的萌芽研究(文部科学省, 15K15118)の研究成果です。	西川義文

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
H28 年 2 月	バベシアとタイレリアは赤血球に寄生し、家畜に大きな経済的被害を与えているため、安全で治療効果の高い薬剤の開発が求められています。本研究では、ハンセン病の治療薬であるクロファジミンの両原虫感染に対する治療効果について検討を行いました。その結果、クロファジミンは培養原虫に対して優れた増殖抑制効果を示しました。更に、マウスを用いた治療実験により、高い治療効果が認められました。	今後の研究により、家畜のピロプラズマ病の新たな治療薬として実用化される事が期待されます。	五十嵐郁男
H28 年 3 月	ネオスポラはイヌやウシなどに感染し神経障害の原因となる病原性原虫ですが、その病態発症メカニズムは分かっていません。今回、ネオスポラのマウス感染モデルを用い、感染による脳組織の変化を解析しました。その結果、炎症反応に伴う脳病変、神経伝達物質量の異常、神経細胞の活性低下が明らかとなりました。本研究により、ネオスポラの感染による中枢神経の機能障害が生じていることが示唆されました。	本論文発表は、最先端・次世代研究開発支援プログラム(日本学術振興会:2011/LS003)、挑戦的萌芽研究(文部科学省:15K15118)、特別研究員奨励費(日本学術振興会:15J03171)の研究成果です。	西川義文

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
フルセラ血清検査	5	1											6
フルセラ抗体検査			9	2	3	2			2	1	3	4	26
PRCD-PRA検査	8	1	9	2	2	1			2	1	3	4	33
EIC検査					2	1			1				4
クリプトスポリジウム検査		1											1
ネオスポラ血清診断		1											1
ネオスポラ抗体診断				100		128							228
トキソプラスマ血清診断		1											1
馬ヒロプラスマ症確定診断				1			1			2	1	1	6
マダニからの小型ヒロプラスマ検査					386	557			22				965
マダニからの大型ヒロプラスマ検査						386			22				408
マダニからのB.ovata 検査							557						557
放牧牛からの小型ヒロプラスマの検査					37			74		2		143	256
放牧牛からの大型ヒロプラスマの検査										2			2
そ の 他	7月ユキヒョウー頭をカナダに輸出するためのトリパノソーマ病(スーラ病)診断検査 9月ユキヒョウー頭をカナダに輸出するためのトリパノソーマ病(スーラ病)診断検査												