

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 2 日現在

機関番号：82603

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23117007

研究課題名（和文）植物由来共生オルガネラの宿主隷属化機構

研究課題名（英文）Controlling mechanism of host by endosymbiont organelle derived from plant

研究代表者

永宗 喜三郎（NAGAMUNE, KISABURO）

国立感染症研究所・寄生動物部・室長

研究者番号：90314418

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 75,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らは、アピコンプレクサに属するトキソプラズマやマラリア原虫がいくつかの植物ホルモンを実際に産生していることを示した。また、その一連の解析の中で、特にマラリア原虫ではサリチル酸が高濃度に蓄積していることを見だし、サリチル酸の宿主免疫を改変機能とマラリアの重症度決定に関与している可能性を示した。

さらに申請者らはアブシジン酸合成阻害剤がトキソプラズマのみならず近縁のネオスポーラに対しても抗原虫作用を持つことを示し、さらに今までに治療薬のないトキソプラズマ組織シストに対する阻害効果を持つ物質をスクリーニングした結果、in vitro、in vivo双方で効果を持つ物質を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：I found that apicomplexan parasites, such as Toxoplasma and Plasmodium have ability to produce some plant hormones. Especially, Plasmodium had high concentration of salicylic acid and we investigated the role in malarial parasites.

I also found that an inhibitor of biosynthesis of abscisic acid inhibited the proliferation of not only Toxoplasma, but also relative parasite, Neospora. Further, I found a chemical which inhibited the growth of tissue cyst of Toxoplasma.

研究分野：寄生虫学

キーワード：アピコンプレクサ 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

アピコンプレクサに属する原虫には現在5000種以上が知られており、全てが寄生性の原生動物である(Levin 1988)。この中にはマラリア原虫やトキソプラズマ、クリプトスポリジウムなど人類にとって大きな脅威となっている感染症が含まれている(Mead 1999, WHO 1999)。これらアピコンプレクサ生物の大きな特徴の一つとしてアピコプラストと呼ばれるオルガネラの存在が挙げられる。アピコプラストは葉緑体が退化してきた4重膜構造の細胞内小器官であり、通常葉緑体は光合成細菌が植物の祖先に取り込まれて進化したものとされているが、アピコプラストは光合成細菌を取り込んだ紅藻類の祖先が原虫の祖先生物に取り込まれることによって成立したと考えられている(Archibald 2002)。そのために、アピコプラストは独特の四重膜構造をとる。現在ではアピコプラストは光合成能を失ったものの、脂肪酸合成などの機能を今でも担っており、したがって原虫にとって必須のオルガネラである(Ralph 2004)。しかしその機能の詳細は不明であり、何故原虫の生存に必須なのかははっきりとはわかっていない。いずれにしても、アピコンプレクサ生物の細胞内には植物が「組み込まれている」ということは今やよく知られた事実となっている。

最近、申請者らはトキソプラズマが植物ホルモンの一種であるアブシジン酸を産生しており、それがトキソプラズマの宿主細胞脱出のシグナルとなり、そしてアブシジン酸の生合成阻害はトキソプラズマのシストへの分化を誘導するという事を明らかにした。また、このホルモンの生合成の特異的阻害剤はトキソプラズマのマウスへの感染を有意に阻止したことから、トキソプラズマにとってアブシジン酸生合成経路は抗原虫薬開発のよい標的である可能性が考えられた(Nagamune, Nature 2008)。申請者は、以上のことから「植物を組み込んでいるアピコンプレクサ生物」は多様な植物ホルモンを自身の増殖や感染の制御に用いているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、トキソプラズマやマラリア原虫の持つ植物ホルモンやその阻害薬の作用を詳細に検討し、アピコンプレクサ生物がどのような植物ホルモンをどのように用いているのかを明らかにすることで、原虫に存在する葉緑体起源のオルガネラ(最内面のマトリョーシカ)が、宿主である原虫(中層マトリョーシカ)の「寄生」という行動をどのように支配しているか、また更に、支配された「寄生体」が「被寄生体」である哺乳類宿主細胞(外面マトリョーシカ)をどのように支配しているのかを理解することを目的とした。

3. 研究の方法

植物ホルモンの網羅的検出は、植物において報告のあったUPLC-ESI-qMS/MS法による高感度・大量解析法(Kojima 2009)を原虫へ応用した。

マラリア原虫への遺伝子導入やマウス病原性の解析は既報に従った(Matsubara 2015)。トキソプラズマやネオスポーラ、マラリア原虫に対する抗原虫効果の判定も既報に従った(Toyama 2012, Ybañez 2016)。

4. 研究成果

申請者らはまず、アピコンプレクサの持つ植物ホルモンの網羅的な検出・定量を試みた。その結果、これまで存在が確認されているアブシジン酸のほか新規に数種の植物ホルモンが検出され、特にマラリア原虫中に大量のサリチル酸の存在を見出した。そこで申請者らは、マラリア原虫をモデルにサリチル酸の生理機能の解析を行った。

熱帯熱マラリア原虫に細菌由来のサリチル酸分解酵素遺伝子を導入し、サリチル酸欠乏原虫を作出した。この変異原虫は野生株と比較して増殖速度などに大きな差は認められなかったが、マラリア原虫が産生することが知られている炎症物質 PGE₂ の産生量が有意に減少していた。このことからサリチル酸と PGE₂ 合成系の関係性、宿主免疫系を改変している可能性が示された。この可能性を検証するため、ネズミマラリア原虫を用い、同様に欠乏原虫を作出した。欠乏原虫は感染試験におけるマウス致死活性が有意に上昇しており、脳組織検査、色素漏出試験の結果、脳マラリアの重症度が亢進していることが確認された。PGE₂ は炎症性サイトカインを介した脳マラリア発症への関与が知られている。そこで感染マウス血中での PGE₂、および各種サイトカインの定量を行ったところ、サリチル酸欠乏原虫では血中 PGE₂ 濃度が減少し、また炎症性サイトカイン産生が亢進していた。以上から、サリチル酸は宿主の PGE₂ および炎症性サイトカイン濃度を変化させ、宿主免疫を改変する機能を持ち、マラリアの重症度決定に関与している可能性が示唆された。

さらに申請者は、これまでの知見を生かし、植物ホルモンやその阻害薬を抗原虫薬として応用できないかその可能性を探るための研究を行った。まず今までの研究で、トキソプラズマに対して抗原虫作用を有することを確認済みであるアブシジン酸生合成阻害剤であるフルリドンが、トキソプラズマに近縁なアピコンプレクサ生物であるネオスポーラに対して抗原虫作用を有するかを確認したところ、*in vitro*あるいは*in vivo*いずれにおいても有意な作用を持つことが確認できた。さらに、今までに治療薬のないトキソプラズマ組織シストに対する阻害効果をもつ物質をスクリーニングした結果、やはり*in vitro*、*in vivo*双方で抗原虫効果を持つ物

質を見出すことができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1) Yamamoto, M., Ma, J.S., Mueller, C., Kamiyama, N., Saiga, H., Kubo, E., Kimura, T., Okamoto, T., Megumi, Okuyama, M., Kayama, H., Nagamune, K., Takashima, S., Matsuura, Y., Soldati-Favre, D., and Takeda, K. "ATF6 is a host cellular target of the *Toxoplasma* virulence factor ROP18." *J. Exp. Med.* 2011, 208, 1533-46

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

3) Toyama, T., Tahara, M., Nagamune, K., Arimitsu, K., Hamashima, Y., Palacpac, N.M.Q., Kawaide, H., Horii, T., and Tanabe, K. "Gibberellin Biosynthetic Inhibitors Make Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum* Cells Swell and Rupture to Death." *PLoS ONE* 2012, 7(3), e32246

4) Kawahara, F., Zhang, G., Suzuki, T., Iwata, A., Nagamune, K., and Nunoya, T. "Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in Japan." *J. Vet. Med. Sci.* 2014, 76 (1), 25-9

5) Matsuo, K., Kamai, R., Uetsu, H., Goto, H., Takashima, Y., and Nagamune, K. "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, horses, pigs and chickens in Japan." *Parasitol. Int.* 2014, 63 (4), 638-639

6) 荒川京子、大橋毅夫、八木田健司、森嶋康之、杉山広、永宗喜三郎、柿沼美智留、長田侑子、黄色大悲、長谷川専、山崎浩 "食肉由来の寄生虫感染による健康被害の判定量的リスク評価手法の開発" *食品衛生研究* 2014, 64 (12), 43-51

7) Yamasaki, H., Arakawa, K., Ohashi, T., Yagita, K., Morishima, Y., Sugiyama, H., Nagamune, K., Kakinuma, M., Osada, Y., Oshiki, D., Hasegawa, A. "Development of a Tool for Evaluating the Risk of Health Damage by Meat-borne Parasite Infection." *Food Safety*, 2014, 2 (4), 151-159

8) Takeshima, K., Sato, K., Nabekura, T., Nagamune, K., Hamada, H., Yoshikawa, H., Shibuya, A., shibuya, K. "Increased CD11b+ Gr-1+ cell population in the placenta after infection with *Toxoplasma gondii*." *Microbiol. Immunol.*, 2015, 59 (2), 95-98

9) Rahman, M., Alauddin, M., Hossain, K.M., Islam, M.H., Kitoh, K., Nagamune, K., Takashima, Y. "Prevalence and dynamics of antibodies against *Toxoplasma gondii* in kids born from naturally infected goats." *Parasitol. Int.* 2015, 64 (5), 389-391

10) Bhat, H.B., Ishitsuka, R., Inaba, T., Murate, M., Abe, M., Makino, A., Kohyama-Koganeya, A., Nagao, K., Kurahashi, A., Kishimoto, T., Tahara, M., Yamano, A., Nagamune, K., Hirabayashi, Y., Jyuni, N., Umeda, M., Fujimori, F., Nishibori, K., Yamaji-Hasegawa, A., Greimel, P., Kobayashi, T. "Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates." *FASEB J.* 2015, 29 (9), 3920-34

11) Matsubara, R., Aonuma, H., Kojima, M., Tahara, M., Andrabi, S.B., Sakakibara, H., Nagamune, K. "Plant Hormone Salicylic Acid Produced by a Malaria Parasite Controls Host Immunity and Cerebral Malaria Outcome." *PLoS ONE* 2015, 10 (10), e0140559

12) Ybañez, R. H., Leesombun, A., Nishimura, M., Matsubara, R., Kojima, M., Sakakibara, H., Nagamune, K., Nishikawa, Y. "In vitro and in vivo effects of the phytohormone inhibitor fluridone against *Neospora caninum* infection." *Parasitol. Int.* 2016, 65 (4), 319-322

13) Tahara, M., Andrabi, S.B., Matsubara, R., Aonuma, H., Nagamune, K. "A host cell membrane microdomain is a critical factor for organelle discharge by *Toxoplasma gondii*." *Parasitol. Int.* 2016, 65 (5), 378-388

〔学会発表〕(計 95 件)

1) 招待講演

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

2) BEST Presentation Award ノミネート

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

3) シンポジウム

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

4) ワークショップ

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

5) シンポジウム

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

6) フォーラム

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

7) シンポジウム

永宗喜三郎、Andrabi, S.B.A.、福土路花、松原立真 “トキソプラズマのオルガネラ分子細胞生物学” 第81回日本寄生虫学会大会 2012年3月、兵庫県西宮市

8) シンポジウム

永宗喜三郎 “「新寄生虫」病学” 第81回日本寄生虫学会大会 2012年3月、兵庫県西宮市

9) サイエンスカフェ

永宗喜三郎 “あなたの知らない寄生虫のセカイ ～トキソ、マラリア、マトリョーシカ～” 第63回バイオeカフェ 2012年9月、つくば

10) シンポジウム

松原立真、永宗喜三郎 “アピコンプレクサ生物の植物ホルモンとその生理機能” 第45回日本原生動物学会大会 2012年11月、兵庫県姫路市

11) シンポジウム

永宗喜三郎、福土路花 “アピコンプレクサ生物の滑走運動とカルシウム・シグナリング” 第45回日本原生動物学会大会 2012年

11月、兵庫県姫路市

12) 講演

永宗喜三郎 “トキソプラズマ” 希少感染症診断技術研修会 国立感染症研究所、2013年2月

13) ワークショップ

田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “トキソプラズマ感染における宿主細胞膜マイクロドメインの役割” 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月、東京

14) ワークショップ

永宗喜三郎、喜屋武向子、山本徳栄、山野安規徳、Asis Khan、L. David Sibley “本邦におけるトキソプラズマ分離株の分子タイピング” 第82回日本寄生虫学会大会 2013年3月、東京

15) ワークショップ

松尾恵梨子、神川龍馬、矢崎裕規、田原美智留、佐倉孝哉、永宗喜三郎、稲垣祐司 “*Karenia* 属渦鞭毛藻における進化的起源の異なる葉緑体型 GAPDH の進化と細胞内局在” 第15回日本進化学会 2013年8月、つくば

16) ワークショップ

永宗喜三郎 “寄生・共生におけるゾンビ化機構の分子生物学的解析” 第36回日本分子生物学会 2013年12月、神戸

17) ワークショップ

田原美智留、Syed Bilal Ahmad Andrabi、青沼宏佳、木下タロウ、永宗喜三郎 “トキソプラズマによる宿主細胞ゾンビ化タンパク質群（ロブトリー蛋白質群）注入における宿主細胞膜マイクロドメインの役割” 第36回日本分子生物学会 2013年12月、神戸

18) シンポジウム

永宗喜三郎 “新たな抗トキソプラズマ薬開発へ向けて：始めの一歩” 第54回日本先天異常学会学術集会 2014年7月、神奈川県相模原市

19) 学校教員向けシンポジウム

永宗喜三郎 “寄生、共生、マトリョーシカ～細胞共生と進化～” 第47回日本原生動物学会大会 2014年11月、仙台

20) ワークショップ

松原立真、小嶋美紀子、榊原均、永宗喜三郎 “マラリア原虫が産生する植物ホルモンと脳マラリア重症化：マウスマラリア原虫をモデルとした研究例” 第37回日本分子生物学会 2014年11月、横浜

21) 市民公開講座

永宗喜三郎 “お肉とネコの寄生虫、トキソプラズマってなにもの？” 日本寄生虫学会市民公開講座：台所とレストランで考える食の安全 知って防ごう トキソプラズマ症 2015年3月、東京都武蔵野市

22) BEST Presentation Award 受賞

松原立真、佐倉孝哉、永宗喜三郎 “トキソプラズマの IP₃・リアノジンレセプター様タンパク質の探索” 第48回日本原生生物学会大会 2015年11月、東京

23) ワークショップ

永宗喜三郎、山野安規徳、福本隼平、喜屋武向子、正谷達膳、松尾智英、松井利博、村上麻美、高島康弘、佐倉孝哉、松原立真 “日本におけるトキソプラズマの分子系統と病原性” 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 2015年12月、神戸

24) ワークショップ

高島康弘、川原史也、永宗喜三郎、戸田なつき、鬼頭克也 “実験感染ニワトリにおける抗トキソプラズマ抗体の産生状況” 第85回日本寄生虫学会大会 2016年3月、宮崎

25) ワークショップ

喜屋武向子、高良武俊、岡野祥、永宗喜三郎 “沖縄県におけるトキソプラズマ感染実態調査と感染要因の推定” 第85回日本寄生虫学会大会 2016年3月、宮崎

26) 国際シンポジウム

永宗喜三郎 “Plant hormones and apicomplexan parasites” 第89回日本細菌学会総会 2016年3月、大阪

27) Symposium

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

28) Keynote Lecture

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

29) Symposium

Nagamune, K., Andrabi, S.B.A., and Matsubara, R. “Apicomplexan parasites and plant hormones” Protist 2012, July 2012, Oslo, Norway

30) Symposium

Nagamune, K. “Extracellular Maturation

in *Toxoplasma gondii* of Plant-like Vacuoles, Essential Organelles of Apicomplexan Parasites.” International Symposium on Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells, July 2013, Kyoto

31) Presentation Prize 受賞

Sakamoto, H., Nagamune, K., Kita, K. and Matsuzaki, M. “Characterization of secondary plastid membrane transporter homologs in *Perkinsus marinus*.” International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, August 2013, Halifax, Canada

〔図書〕(計15件)

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

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

3) 永宗喜三郎 「アピコンプレクス門原虫が産生する植物ホルモン様物質とその作用」 日生研たより 2012, 58: 24-28

4) 福土路花、松原立真、永宗喜三郎 「*Toxoplasma gondii* ～三日月に恋してる～」 原生動物園 2012, 3: 3-7

5) 永宗喜三郎 「トキソプラズマ症とは」 感染研 HP 2012

6) 永宗喜三郎 「妊婦さんおよび妊娠を希望されている方へ」 感染研 HP 2012

7) 喜屋武向子、松原立真、永宗喜三郎 「トキソプラズマ症と沖縄県におけるトキソプラズマの流行状況について」 防菌防黈 2013, 41: 19-28

8) 永宗喜三郎 「オモロいのは名前だけじゃない! ～マトリョーシカ型進化原理～」 細胞工学 2013, 32: 226-231

9) 永宗喜三郎 「トキソプラズマ症」 IDWR 感染症発生動向調査 感染症週報 2013, 15: 20-25

10) 永宗喜三郎、松原立真、田原美智留、佐倉孝哉 「明日に向かってスベレ! 細胞運動獲得モデル: アピコンプレクサ類生物」 細胞工学 2014, 33: 774-776

11) 福本隼平、永宗喜三郎 「トキソプラズマ分子疫学の現状」 獣医寄生虫学会誌

2014, 13: 74-79

12) 渡邊智美、永宗喜三郎 「トーチの会とその活動：母親たちの願いから啓発活動へ」
獣医寄生虫学会誌 2014, 13: 110-114

13) 松原立真、永宗喜三郎 「アピコンプレクサ生物におけるカルシウム・シグナリングと植物ホルモン」化学療法の領域 2016, 32: 117-126

14) 松原立真、永宗喜三郎 「アピコンプレクサ類のもつ植物様オルガネラと植物ホルモン -オルガネラ進化学から考える感染症対策」遺伝 2016, 70:99-104

15) 永宗喜三郎 「お肉とネコの寄生虫、トキソプラズマってナニモノ？」衛生の友 2016, 59: 2

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

なし

取得状況（計 件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

永宗喜三郎 (NAGAMUNE, Kisaburo)
国立感染症研究所・寄生動物部・室長
研究者番号：90314418

(2)研究分担者

西川義文 (NISHIKAWA, Yoshihumi)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
研究者番号：90431395

加藤健太郎 (KATO, Kentaro)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・特任准教授
研究者番号：30401178

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()