

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780263

研究課題名 (和文) 宿主細胞侵入に関わる原虫酵素群の基質探索系の確立

研究課題名 (英文) Establishment of substrates exploration of protozoan enzymes associated with invasion into host cells

研究代表者

加藤 健太郎 (KATO KENTARO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号:30401178

研究成果の概要 (和文)：原虫の複雑なライフサイクルの中で、Ca²⁺シグナルに関わる酵素であるプロテインキナーゼの基質及び感染における役割を解析することで、これらの酵素群があるステージから次のステージに移行するのに重要なシグナル伝達を担っているという知見が研究成果として数多く得られた。これらの研究成果は、原虫のステージ移行に重要となる原虫酵素群を阻害することで原虫独特のライフサイクルを遮断する、新しい原虫薬の開発につながると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：We have got some results that protozoa enzymes including protein kinases take parts in the important signal transductions for parasites to transfer from a stage to the next stage by analyzing the substrates and functions of enzymes relating with calcium signaling in their complicated life cycles. These results lead to the new anti-protozoan drug developments to block the protozoa-specific life cycle by inhibiting the functions of the important protozoan enzymes in the stage transfer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：原虫、基質、酵素、宿主細胞侵入

1. 研究開始当初の背景

家畜に重篤な症状、経済的損失を引き起こす病原寄生虫は、法定伝染病であるピロプラズマ病の病因であるバベシア、タイレリアをはじめ、コキシジウム、トキソプラズマ、サルコシスティス、ロイコチトゾーン、鶏マラ

リア、クリプトスポリジウム等、その多くが原虫類のアピコンプレックス類に属している。アピコンプレックス類に属する原虫は、その栄養型虫体の先端にApical complexと呼ばれる特徴的な構造を持っており、また、その生活環、感染様式、媒介昆虫にも類似性が見ら

れ、かつ他の生物種には見られない特徴的なものとなっている。さらに驚くべきことに、近年の進化学的解析によりアピコンプレックス類は進化系統樹的に渦鞭毛藻類と近縁であることが明らかとなった。このことはアピコンプレックス類がアピコプラストと呼ばれる退化した葉緑体と考えられる細胞小器官を共有していることから裏付けられている。

現在、畜産・獣医学領域で行われている動物の原虫感染症に対する治療・予防はサルファ剤等の化学薬剤による駆虫、あるいは有効な治療法が無いというのが現状である。化学薬剤による駆虫は効果を発揮した場合でも原虫根治には至らず、また、耐性株の出現も起こるため長期の使用ができず、根本的な対策とはなり得ない。

以上のことを踏まえ、本研究ではアピコンプレックス類の中でも原虫培養系及び動物実験系等がすでに確立しているトキソプラズマ原虫とマラリア原虫に焦点を当て、その宿主細胞侵入に関わる原虫プロテインキナーゼ (PK)、特にアピコンプレックス類及び植物において主に保存されている CDPK (Calcium dependent protein kinase) の基質スクリーニング系の確立を行う。さらに、ここで得られた知見を他の原虫に応用することで、新しい抗原虫戦略を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小麦胚芽無細胞蛋白質合成系を利用することで研究代表者らが確立した原虫 PK の発現・精製系を用いて、原虫 PK の基質蛋白質同定を目指したゲノムワイドなスクリーニング系の確立にある。さらに、アピコンプレックス類で保存されている PK、特に CDPK の機能発現機構を基質、会合分子との相互作用の点から解析することにより、原虫独特の生活環を遮断する新たな抗原虫薬・原虫ワクチンを開発する際に不可欠である原虫の遺伝子発現機構、シグナル伝達機構の根本的な解明、開発に有用な基礎的データを蓄積する。

3. 研究の方法

原虫の感染環は、大別すると宿主体内と媒介昆虫内等の宿主体外に分かれる。家畜に主

な臨床症状を引き起こすのは、宿主体内で宿主細胞に原虫が侵入し、増殖・破壊を繰り返すステージである。この宿主細胞侵入には様々な原虫酵素が関わっていることが知られているが、本研究では侵入に関係する原虫 PK に注目し、その宿主細胞侵入時における生物学的意義つまりその役割について解析を行う。我々の研究グループでは、世界に先駆けて活性のある原虫 PK の発現・精製、及び酵素活性測定についての手法を確立した。さらに、この中でカルシウム/カルモジュリン依存性 PK が原虫の宿主細胞侵入に関わることを発見した。本研究ではその次のステップとして、原虫 PK の基質スクリーニング系の確立を目指し、これらの原虫酵素群がその感染に果たす役割の解明を行った。

① 原虫PKの基質スクリーニング系の確立

原虫はその種によって、特にマラリア原虫では、そのゲノム配列の特異性から分子生物学研究で汎用されている大腸菌、酵母、バキュロウイルスなどを用いた蛋白質発現系では十分な発現量が得られにくいことが多いことから、基質スクリーニングに使える可能性がある系も限られる。以上のような理由から、実現の可能性のある複数の系から基質スクリーニング系の確立を模索した。

複数の発現系から得られた基質候補蛋白質について、原虫のゲノムデータベースや種々の kinomics データベースを利用して機能ドメインなどのバイオインフォマティクス解析を行い、基質蛋白質の絞り込みを行った。同定された基質候補蛋白質について共免疫沈降反応、GST pull-down 法、*in vitro* キナーゼアッセイ等により基質であるかを解析した。また、直接的には原虫 PK の基質ではないが、リン酸化反応などの感染に伴うシグナル伝達系を制御する分子も含まれる可能性が高いため、それらの制御蛋白質についても併せて以下の解析を行った。

② 原虫感染時における基質リン酸化に伴うシグナル伝達系の生物学的意義の解析

原虫PK、その基質蛋白質に対する抗体を用いて、感染細胞中での原虫PK、基質の局在の

原虫の各感染ステージにおける変化について解析した。原虫PKに特異的な阻害剤を用いて、感染細胞中での原虫PK、基質の局在の変化を *in vitro* において評価した。

4. 研究成果

以下にそれぞれの原虫 PK の性状解析の研究成果を述べる。

・ TgCDPK1 (calcium-dependent protein kinase 1)

プロテインキナーゼに対する阻害剤誘導体 1NM-PP1 は主に酵母学分野で研究されてきた。プロテインキナーゼのアミノ酸の中で 1NM-PP1 の感受性決定側鎖の分子量が小さいほど、その阻止効果を発揮し、このようなプロテインキナーゼを ASKA (analog sensitive kinase allele) と呼ぶ。トキソプラズマ原虫の野生株に存在する ASKA をゲノムから予測した結果、TgCDPK1 のみが分子量が最小のグリシンを 1NM-PP1 の感受性決定側鎖に持つ ASKA であることが予測された。実際、トキソプラズマ原虫の野生株 (親株; RH/ht⁻) は 1NM-PP1 に感受性であるが、最も感受性を持つと予測された CDPK1 の非 ASKA 変異体を発現させた RH/ai-C1 株は、1NM-PP1 に対する耐性を獲得した。TgCDPK1 は侵入を制御することが報告されていた。1NM-PP1 による TgCDPK1 の阻害では宿主細胞侵入率は 40% へ低下し、滑走運動については低下したが、マイクロネーム分泌は影響を受けなかった。

また、感染・増殖した後、細胞を破壊し、虫体が放出されるステップが 1NM-PP1 によって抑えられ、逆に休眠体であるブラディゾイトに移行することが明らかとなった。さらに、1-NM-PP1 の効果をトキソプラズマ原虫感染マウスによって解析した。その結果、1-NM-PP1 の腹腔投与により、脳、肝臓、肺におけるトキソプラズマ原虫の感染が有意に低下した。

・ TgCDPKif3 (calcium-dependent protein kinase isoform 3)

タキゾイドでの TgCDPKif3 の局在は宿主細胞内での増殖期では細胞質にあり、宿主細胞の破壊、脱出後の宿主細胞外のタキゾイドで

は TgCDPKif3 は吻側部に収束するのが観察された。また、glideosome の構成因子である aldolase を *in vitro* でリン酸化し、その被リン酸化部位についても絞ることに成功した。さらに、哺乳類細胞中で両蛋白質を過剰発現させることで、共免疫沈降反応によって両蛋白質の結合が示された。

・ PfCDPK4 (calcium-dependent protein kinase 4)

PfCDPK4 のリン酸化は、*Plasmodium berghei* において雄性ガメトサイトの鞭毛放出を惹起するとされる物質である xanthurenic acid (XA) の存在下で、かつ pH7.5-8.0 の条件下で活性化された。ヒトの血管内の生化学的条件から蚊の体内の条件に移行する過程 (pH 上昇と温度低下) で、PfCDPK4 のリン酸化の活性化がみられた。

PfCDPK4 に対する抗体を作製し、成熟ガメトサイト期において PfCDPK4 の発現を確認した。成熟ガメトサイト期における XA やヒト血清の添加による刺激により PfCDPK4 の発現上昇がみられた。雄性ガメトサイトのマーカーである alpha-tubulin II 発現ガメトサイトにおいて、PfCDPK4 の発現が観察された。このことから我々の作製した PfCDPK4 に対する抗体は、熱帯熱マラリア原虫の雄性ガメトサイトマーカーとして利用できることが明らかとなった。無性生殖期において、赤血球に侵入直後のリング型虫体においても PfCDPK4 の発現が観察された

・ TgPKA-c (cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit)

トキソプラズマ原虫の PKA-c についてはいまだ報告がなかったが、今回その遺伝子を同定し、その薬剤感受性について解析を行った。また、未同定であった regulatory subunit (TgPKA-r) を同定し、原虫内で過剰発現されることで原虫の宿主細胞内での増殖が低下することが明らかとなった。哺乳類細胞では PKA-c は PKA-r 及び、protein kinase inhibitor (PKI) の 2 つの分子によって、機能発現の調節を受けているが、トキソプラズマ原虫では PKI に対する相同遺伝子が見つからず、哺乳類の PKI の存在下で原虫の増殖に

は影響が無かった。

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6件) すべて査読有。

- ① Kurokawa H, Kato K (corresponding author), Iwanaga T, Sugi T, Sudo A, Kobayashi K, Gong H, Takemae H, Recuenco FC, Horimoto T, Akashi H. Identification of *Toxoplasma gondii* cAMP dependent protein kinase and its role in the tachyzoite growth. **PLoS One**. In press. (2011)
- ② Sugi T, Kato K (corresponding author), Kobayashi K, Kurokawa H, Takemae H, Gong H, Recuenco FC, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H. 1NM-PP1 treatment of mice infected with *Toxoplasma gondii*. **J Vet Med Sci**. In press. (2011)
- ③ Zahoor MA, Yamane, D, Mohamed YM, Suda Y, Kobayashi K, Kato K, Tohya T, Akashi H. Bovine viral diarrhoea virus nonstructural protein 5A interacts with NIK and IKK β -binding protein (NIBP). **J Gen Virol**. 91:1939-1948. (2010)
- ④ Sugi T, Kato K (corresponding author), Kobayashi K, Watanabe S, Kurokawa H, Gong H, Pandey K, Takemae H, Akashi H. Use of the kinase inhibitor analog 1NM-PP1 reveals a role for *Toxoplasma gondii* CDPK1 in the invasion step. **Eukaryot Cell**. 9:667-670. (2010)
- ⑤ Sugi T, Kato K (corresponding author), Kobayashi K, Pandey K, Takemae H, Kurokawa H, Tohya Y, Akashi H. Molecular analyses of *Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3. **Parasitol Int**. 58:416-423. (2009)
- ⑥ Kato K (corresponding author), Sudo A, Kobayashi K, Sugi T, Tohya Y, Akashi H. Characterization of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein

kinase 4. **Parasitol Int**. 58:394-400. (2009)

[学会発表] (計8件)

- ① Kentaro Kato, Atsushi Sudo, Kyousuke Kobayashi, Tatsuki Sugi, Yukinobu Tohya, Hiroomi Akashi. "Characterization of *Plasmodium falciparum* calcium-dependent protein kinase 4" XIIth International Congress of Parasitology (ICOPAXII), Melbourne, Australia, 2010. 8
- ② 黒川 瞳、加藤健太郎、首藤篤史、小林郷介、杉達紀、竹前等、ゴン海燕、堀本泰介、明石博臣 "トキソプラズマ原虫におけるcAMP依存性プロテインキナーゼの機能解析" 第18回分子寄生虫ワークショップ, 群馬, 2010. 8
- ③ 杉達紀、加藤健太郎、小林郷介、明石博臣 "ASKA法によって明らかにされた、トキソプラズマ原虫 CDPK1による滑走運動制御" 第79回日本寄生虫学会, 北海道, 2010. 5
- ④ 加藤健太郎 "マラリア原虫独自酵素によるその巧妙なライフサイクルコントロール" 第149回日本獣医学会, 東京, 2010. 3. 第1回獣医寄生虫学奨励賞受賞
- ⑤ 杉達紀、加藤健太郎、小林郷介、遠矢幸伸、明石博臣 "トキソプラズマ原虫 CDPKの原虫生活環における役割" 第148回日本獣医学会, 鳥取, 2009. 9
- ⑥ 加藤健太郎、小林郷介、杉達紀、遠矢幸伸、明石博臣 "マラリア原虫のPfCDPK4の有性生殖期における発現解析" 第148回日本獣医学会, 鳥取, 2009. 9
- ⑦ 杉達紀、加藤健太郎、小林郷介、黒川瞳、明石博臣 "アピコンプレクサ門原虫プロテインキナーゼ特異的阻害剤探索" 第17回分子寄生虫ワークショップ, 群馬, 2009. 8
- ⑧ 山根大典、加藤健太郎、遠矢幸伸、明石博臣 "牛ウイルス性下痢ウイルスによるスフィンゴ脂質代謝制御を介したウイルス複製機構の解析" 第147回日本獣医学会, 栃木, 2009. 4

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：*Toxoplasma gondii* RON4-binding molecules by retrovirus-mediated expression cloning

発明者：Kentaro Kato, Taisuke Horimoto, Hiroomi Akashi, Hitoshi Takemae

権利者：同上

種類：特許権

番号：US61/447330

出願年月日：2010年2月28日

国内外の別：国外

〔その他〕

無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 健太郎 (KATO KENTARO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号:30401178

(2) 研究分担者

無し。

(3) 連携研究者

無し。