

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24688032

研究課題名(和文)原虫感染において糖鎖が果たす役割

研究課題名(英文)Roles of carbohydrates in protozoan infection

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円

研究成果の概要(和文)：原虫感染における糖鎖の役割について、以下の研究成果を得た。質量解析を用いて、原虫の膜蛋白質に結合するレセプター因子を含む複数の宿主細胞因子を同定した。また、原虫の感染阻止に効果的な物質を作製するため、多糖類に硫酸化等の修飾を付加した物質を作製し、細胞培養系においてその原虫侵入阻害、増殖阻害の効果を解析した。さらに硫酸化等の化学修飾を付加した糖鎖について、原虫感染を阻害する糖鎖分子と実際に結合する原虫蛋白質の同定に成功した。また、同定した原虫分子が実際に宿主細胞に結合することが示された。これにより、原虫感染に関わる糖鎖レセプターの役割を解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We got the results of roles of carbohydrates in protozoan infection as described below. The host factors bound with protozoan secreted proteins have been detected. The polysaccharides have been sulfated to manufacture materials effective in the inhibition of infection. Using these sulfated polysaccharides, we analyzed the effects on invasion inhibition and growth inhibition. We have detected the protozoan proteins actually bound with the sulfated polysaccharides which can inhibit the protozoan growth. Therefore, we succeeded in analyzing roles of carbohydrates in protozoan infection.

研究分野：寄生虫学

キーワード：原虫 糖鎖 宿主細胞侵入 感染 抗原虫薬

1. 研究開始当初の背景

原虫感染症はその多くが法定・届出伝染病、海外悪性伝染病、国際獣疫疾病及び感染症予防法において指定を受けていることから明らかなように畜産・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。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、コクシジウム、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、その多くが食肉用家畜に大きな被害をもたらしているが、現在のところその対策はサルファ剤等の古典的な化学薬剤に頼ったものであり、耐性原虫の出現も多く、根本的な駆虫には至っていない。また、現在日本においては、BSE、新型インフルエンザウイルス、口蹄疫に代表される感染症による食に対する危機感が蔓延しており、特に食肉産業における国民の不信感は極めて大きい。

研究代表者らは、根本的な原虫病の撲滅をはかるためには原虫独特の生活環における原虫感染(宿主細胞侵入)のメカニズムの理解が必要であると考え、原虫の宿主細胞レセプター同定系の確立を進め、これに成功した。さらに主に同系を用いて、(1) マラリア原虫の膜抗原 BAEBL の赤血球侵入レセプターがヘパラン硫酸であることを、(2) トキソプラズマ原虫の膜抗原 MIC13 のレセプターがシアル酸であることを、(3) トキソプラズマ原虫の新規膜抗原 P104 のレセプターがコンドロチン硫酸であることを、(4) トキソプラズマ原虫の膜抗原 RON4 のレセプターがヘパラン硫酸であることを同定した。同定した上記の3つのレセプターについては全て糖鎖レセプターであった。また、マラリア原虫の BAEBL が属する膜抗原 DBL (Duffy Binding Like)ファミリーや RBL (Reticulocyte Binding Like)ファミリーの分子が BAEBL と同じく、ヘパラン硫酸の類似化合物であるヘパリンに結合性があることから、ヘパリンの誘導體群を用いてマラリア原虫の赤血球侵入試験を行った結果、最も侵入阻止に効果のある構造を決定した。また、同系とは別の系を用いて、研究代表者らはマラリア原虫の膜抗原の1つであり、その有力なワクチンターゲット分子である AMA-1 の赤血球膜レセプターが

Kx 蛋白質であることを同定することに成功している。

原虫のレセプター研究における国外における動向であるが、世界的には主にシアル酸について研究が進められてきた。つまり、トキソプラズマ原虫の膜抗原 MIC1 のレセプターがシアル酸であることが知られていた。しかしながら、例えばトキソプラズマ原虫の膜抗原については現在のところ 50 個以上が推定されているにもかかわらず、未だその大半の分子について感染において果たす役割及び、それらの宿主細胞レセプターについては不明である。クリプトスポリジウム原虫、タイレリア原虫については膜抗原と推定されているものも数が少なく、それらのレセプターについてはほとんど同定されていない。

2. 研究の目的

このような研究動向の中、研究代表者らは独自に開発した原虫レセプター同定系を有しているため、これら一連の原虫感染レセプター研究において優位な立場にある。本研究ではさらなる原虫感染レセプターの同定とレセプターとして同定した糖鎖について原虫感染に果たす役割について解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

以下の方法によって、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、タイレリア、マラリア原虫において、これらの原虫感染に糖鎖が果たす役割について解析を行った。

- (1) 我々が独自に開発したレトロウイルスベクターを用いた原虫レセプター同定系を用いて、*in silico*分析により絞り込んだ原虫膜抗原のレセプターの同定を進めた。磁気ビーズを使用する等、スクリーニングのステップがより効率的に行えるような工夫を施した。
- (2) Flag や c-Myc 等の複数のタグと原虫膜抗原との融合蛋白質となるようにした組換え原虫を作製する。このような組換え原虫を宿主細胞に感染させ、タグに対する抗体により複数の免疫沈降反応を行う。ここで原虫膜抗原と結合して一緒に沈降してきた蛋白質を電気泳動により分離し、

質量解析により、このレセプター候補分子の同定を行った。

- (3) 糖鎖レセプターに対する阻害薬を用いて、まずは培養細胞において原虫の増殖阻止試験を行った。また、同定したレセプターに対する抗体を用いて培養細胞での原虫の増殖阻止試験を行った。阻止能が確認された場合、実際に原虫に感染させた実験動物に対してもその感染阻止能があるか否かを検討した。

4. 研究成果

トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、タイレリア、マラリア原虫に関して、それらの感染における糖鎖の役割について、以下の研究成果を得た。質量解析を用いて、原虫の膜蛋白質に結合するレセプター因子を含む複数の宿主細胞因子を同定した。また、原虫の感染阻止に効果的な物質を作製するため、多糖類に硫酸化等の修飾を付加した物質を作製した。

原虫の膜蛋白質と結合する宿主細胞因子として同定した糖鎖レセプターの原虫感染状態における機能解析を行った。さらに硫酸化等の化学修飾を付加した糖鎖について、細胞培養系においてその原虫侵入阻害、増殖阻害の効果を解析した。特に硫酸化多糖類の一種であるデキストラン硫酸について、トキソプラズマの侵入阻害、増殖阻害の効果を細胞培養系及びマウス、ブタの動物感染実験系において確認した。また、硫酸化ジェランがマラリア原虫の増殖阻止、赤血球侵入の阻害に効果があり、かつ宿主細胞への毒性もほとんどないことを明らかとした。

原虫感染を阻害する糖鎖分子と実際に結合する原虫蛋白質の同定に成功した。また、同定した原虫分子が実際に宿主細胞に結合することが示された。これにより、原虫感染に関わる糖鎖レセプターの役割を解析することに成功した。

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 1 1 件)

以下、全ての雑誌論文について査読有り。

Recuenco FC, Takano R, Chiba S, Sugi T, Takemae H, Murakoshi F, Ishiwa A, Inomata A, Horimoto T, Kobayashi Y, Horiuchi N, Kato K (corresponding author). Lambda-carrageenan treatment exacerbates the severity of cerebral malaria caused by *Plasmodium berghei* ANKA in BALB/c mice. *Malar J.* 13:487. (2014) doi: 10.1186/1475-2875-13-487. Takemae H, Sugi T, Kobayashi K, Murakoshi F, Recuenco FC, Ishiwa A, Inomata A, Horimoto T, Yokoyama N, Kato K (corresponding author). Analyses of the binding between *Theileria orientalis* major piroplasm surface proteins and bovine red blood cells. *Vet Rec.* 175:149. (2014) doi: 10.1136/vr.102535. Takemae H, Sugi T, Kobayashi K, Murakoshi F, Gong H, Recuenco FC, Ishiwa A, Inomata A, Horimoto T, Yokoyama N, Kato K (corresponding author). Interaction between *Theileria orientalis* 23-kDa piroplasm membrane protein and heparin. *Jpn J Vet Res.* 62:17-24. (2014) Recuenco FC, Kobayashi K, Ishiwa A, Enomoto-Rogers Y, Fundador NGV, Sugi T, Takemae H, Iwanaga T, Murakoshi F, Gong H, Inomata A, Horimoto T, Iwata T, Kato K (corresponding author). Gellan sulfate inhibits *Plasmodium falciparum* growth and invasion of red blood cells *in vitro*. *Sci Rep. (Nature Publishing Group)* 4:4723. (2014) doi: 10.1038/srep04723. **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研究成果(2014年4月23日)、十勝毎日新聞記事掲載(2014年5月2日1面)、UTokyo Research 記事掲載(2014年5月14日)、北海道新聞記事掲載(2014年5月22日朝刊27面)**

Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Ishiwa A, Recuenco FC, Murakoshi F, Xuan X, Horimoto T, Akashi H, Kato K (corresponding author). Characterization and binding analysis of a microneme adhesive repeat domain-containing protein from *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int.* 63: 381-388. (2014) doi: 10.1016/j.parint.2013.12.006.

Takemae H, Sugi T, Kobayashi K, Gong H, Ishiwa A, Recuenco FC, Murakoshi F, Iwanaga T, Inomata A, Horimoto T, Akashi H, Kato K (corresponding author). Characterization of the interaction between *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 4 and host cellular α -tubulin. *Sci Rep. (Nature Publishing Group)* 3: 3199. (2013) doi: 10.1038/srep03199. **東京大学大学院農学生命科学研究科プレスリリース、帯広畜産大学プレスリリース (2013年11月13日)** **十勝毎日新聞記事掲載 (2013年11月25日24面)** **UTokyo Research 記事掲載 (2013年12月2日)** **北海道新聞記事掲載 (2013年12月17日朝刊22面)**

Kobayashi K, Takano R, Takemae H, Sugi T, Ishiwa A, Gong H, Recuenco FC, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, Kato K (corresponding author). Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep. (Nature Publishing Group)* 3: 3178. (2013) doi: 10.1038/srep03178. **東京大学大学院農学生命科学研究科プレスリリース、帯広畜産大学プレスリリース (2013年11月13日)** **Todai Research 記事掲載 (2013年11月21日)** **日経産業新聞記事掲載 (2013年11月21日11面)** **十勝毎日新聞記事掲載 (2013年11月25日24面)** **北海道新聞記事掲載 (2013年11月26日朝刊25面)**

Ishiwa A, Kobayashi K, Takemae H, Sugi T, Gong H, Recuenco FC, Murakoshi F, Inomata A, Horimoto T, Kato K (corresponding author). Effects of dextran sulfates on the acute

infection and growth stages of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res.* 112: 4169-4176. (2013) doi: 10.1007/s00436-013-3608-8.

Gen F, Yamada S, Kato K, Akashi H, Kawaoka Y, Horimoto T. Attenuation of an influenza A virus due to alteration of its hemagglutinin-neuraminidase functional balance in mice. *Arch Virol.* 158:1003-1011. (2013) doi: 10.1007/s00705-012-1577-3.

Kato K (corresponding author), Sugi T, Iwanaga T. Roles of Apicomplexan protein kinases at each life cycle stage. *Parasitol Int.* 61: 224-234. (2012) doi: 10.1016/j.parint.2011.12.002.

Malaria Nexus 記事掲載 (2012年3月9日)

Gong H, Kobayashi K, Sugi T, Takemae H, Kurokawa H, Horimoto T, Akashi H, Kato K (corresponding author). A novel PAN/apple domain-containing protein from *Toxoplasma gondii*: characterization and receptor identification. *PLoS One.* 7:e30169. (2012) doi: 10.1371/journal.pone.0030169.

[学会発表](計20件)

猪又 敦子、村越 ふみ、石和 玲子、堀本 泰介、加藤健太郎 「*Cryptosporidium parvum* の elongation factor 1 α は宿主細胞表面のヘパラン硫酸と相互作用する」 第84回日本寄生虫学会大会、杏林大学(東京都・三鷹市)、2015年3月

高野 量、秦 裕子、竹前 等、尾山 大明、加藤 健太郎 「熱帯熱マラリア原虫寄生赤血球にみられるマウレル裂を構成する因子の網羅的同定」 第84回日本寄生虫学会大会、杏林大学(東京都・三鷹市)、2015年3月

加藤健太郎 「原虫病感染症の制御と克服に向けて - マラリアとクリプトスポリジウム」 文部科学省科研費 新学術領域『プラズマ医療科学の創成』原虫病研究会、とかちプラザ(北海道・帯広市)、2014年11月

猪又敦子、村越ふみ、石和玲子、堀本泰介、**加藤健太郎**「クリプトスポリジウム原虫のヘパリン結合性感染抑制因子の解析」第157回日本獣医学会、北海道大学(北海道・札幌市)、2014年9月
土生川佳世、小林郷介、**加藤健太郎**「マラリア原虫とヘパリンと私」第22回分子寄生虫ワークショップ・第12回マラリア研究フォーラム 合同大会、帯広畜産大学(北海道・帯広市)、2014年9月
竹前等、**加藤健太郎**「侵入時におけるトキソプラズマ原虫 RON 複合体と宿主細胞骨格分子の相互作用」第22回分子寄生虫ワークショップ・第12回マラリア研究フォーラム 合同大会、帯広畜産大学(北海道・帯広市)、2014年9月
猪又敦子、村越ふみ、堀本泰介、**加藤健太郎**「*Cryptosporidium parvum* EF1-のヘパリン結合性とその機能解析」第22回分子寄生虫ワークショップ・第12回マラリア研究フォーラム 合同大会、帯広畜産大学(北海道・帯広市)、2014年9月
高野量、尾山大明、秦裕子、**加藤健太郎**「熱帯熱マラリア原虫分泌タンパク質の探索」第22回分子寄生虫ワークショップ・第12回マラリア研究フォーラム 合同大会、帯広畜産大学(北海道・帯広市)、2014年9月
石和玲子、杉達紀、レクエンコ・フランセス、村越ふみ、竹前等、堀本泰介、**加藤健太郎**「硫酸化多糖類によるトキソプラズマ原虫の感染およびマウス生存率に与える影響」第83回日本寄生虫学会、愛媛大学(愛媛県・松山市)、2014年3月
猪又敦子、村越ふみ、石和玲子、堀本泰介、**加藤健太郎**「ヘパリンのクリプトスポリジウム原虫に対する感染阻害機構の解析」第83回日本寄生虫学会、愛媛大学(愛媛県・松山市)、2014年3月
竹前等、杉達紀、高野量、村越ふみ、Recuenco Frances C.、**加藤健太郎**「トキソプラズマ原虫 RON 複合体と宿主細胞骨格分子の相互作用の解析」第83回日本寄生虫学会、愛媛大学(愛媛県・松山市)、2014年3月
高野量、竹前等、杉達紀、田坂修也、**加**

藤健太郎「マラリア原虫感染赤血球における分泌タンパク質のインタラクトーム解析」第83回日本寄生虫学会、愛媛大学(愛媛県・松山市)、2014年3月
Recuenco Frances Cagayat、Herbas Maria Shirley、杉達紀、竹前等、高野量、村越ふみ、石和玲子、**加藤健太郎**「Lambda carrageenan treatment induces cerebral malaria in BALB/c mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA」第83回日本寄生虫学会、愛媛大学(愛媛県・松山市)、2014年3月
Frances Recuenco、小林郷介、石和玲子、ロジャース有希子、Noreen Fundador、杉達紀、竹前等、岩永達也、村越ふみ、猪又敦子、堀本泰介、岩田忠久、**加藤健太郎**「Assessing the microbial polysaccharide gellan gum and its sulfated derivative on their inhibition of growth of *Plasmodium yoelii* 17XL in BALB/c mice」第156回日本獣医学会、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)、2013年9月
竹前等、杉達紀、高野量、村越ふみ、Recuenco Frances C.、石和玲子、堀本泰介、横山直明、**加藤健太郎**「小型ピロプラズマ主要膜抗原と結合する宿主因子の解析」第156回日本獣医学会、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)、2013年9月
猪又敦子、村越ふみ、石和玲子、**加藤健太郎**、堀本泰介「クリプトスポリジウム原虫に対する感染阻害糖鎖の探索および阻害機構の解明」第156回日本獣医学会、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)、2013年9月
石和玲子、杉達紀、竹前等、レクエンコ・フランセス、村越ふみ、猪又敦子、ロジャース有希子、フンダドル・ノリオン、堀本泰介、岩田忠久、**加藤健太郎**「硫酸化多糖類投与によるトキソプラズマ原虫感染・増殖に対する影響」第156回日本獣医学会、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)、2013年9月
高野量、田坂修也、**加藤健太郎**「マラリア原虫分泌蛋白質のインタラクトーム解析」第21回分子寄生虫ワークショップ、神戸セミナーハウス(兵庫県・神戸市)、2013年8月

石和玲子、杉 達紀、竹前 等、レクエンコ・フランセス、村越ふみ、猪又敦子、堀本泰介、**加藤健太郎**「硫酸化多糖類によるトキソプラズマ原虫感染・増殖阻害効果の解析」第 21 回分子寄生虫ワークショップ、神戸セミナーハウス(兵庫県・神戸市)、2013 年 8 月
猪又敦子、村越ふみ、石和玲子、堀本泰介、**加藤健太郎**「多糖鎖によるクリプトスポリジウム原虫に対する感染阻害」第 21 回分子寄生虫ワークショップ、神戸セミナーハウス(兵庫県・神戸市)、2013 年 8 月

〔図書〕(計 13 件)

加藤健太郎、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」トキソプラズマ原虫のブタを用いた感染実験、2014、179 (27-28)
猪又敦子、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」クリプトスポリジウム原虫のマウスでの継代と原虫オーシストの糞便からの精製、2014、179 (29-32)
村越ふみ、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」クリプトスポリジウム原虫における培養細胞を用いた感染・増殖阻害アッセイ、2014、179 (105-106)
加藤健太郎、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」熱帯熱マラリア原虫の赤血球侵入試験、2013、166 (91-92)
レクエンコ フランセス、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」熱帯熱マラリア原虫の増殖阻害試験、2013、166 (89-90)
石和玲子、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」マウスを用いたトキソプラズマ原虫感染実験、2013、166 (51-53)
竹前 等、小林郷介、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」トキソプラズマ原虫膜抗原の糖鎖結合性の解析法、2013、166 (27-29)
田坂修也、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」赤内期における熱帯熱マラリア原虫の培養法、2013、166 (47-50)
小林郷介、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫

研究 材料と方法」ヘパリンを用いた熱帯熱マラリア原虫の同調培養法、2012、154 (37-40)
ゴン海燕、玄学南、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」プルダウン法を用いたトキソプラズマ原虫の宿主細胞レセプターの同定、2012、154 (103-104)
石和玲子、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」培養細胞を用いたトキソプラズマ原虫培養系における感染・増殖阻害アッセイ、2012、154 (105-108)
岩永達也、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」熱帯熱マラリア原虫の培養系における増殖阻害アッセイ、2012、154 (109-110)
杉達紀、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」トキソプラズマ原虫の培養と精製、2012、154 (41-44)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~globalinfection/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

無し。

(3) 連携研究者

無し。