

平成 21 年 9 月 1 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2006 -2008

課題番号：1 8 6 8 8 0 1 7

研究課題名（和文） 新しい抗原虫戦略を目指した原虫プロテインキナーゼの機能解析

研究課題名（英文） Characterization of protozoan protein kinases aiming at the new anti protozoan strategy

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：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をはかるためには、原虫独特の生活環を遮断することができる抗原虫薬・駆虫薬の開発が求められる。本研究では、原虫プロテインキナーゼに焦点を当て、プロテインキナーゼ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、新たな抗原虫薬開発へとつなが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、また、開発に有用な基礎的データの蓄積を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
年度			
年度			
総計	22,300,000	6,690,000	28,990,000

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、寄生虫、プロテインキナーゼ、リン酸化

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も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。また、現在、日本においては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大い。根本的な

原虫病の撲滅をはかるためには、原虫独特の生活環を遮断することができる抗原虫薬・駆虫薬の開発が求められる。

2. 研究の目的

このような家畜に重篤な症状、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、サルコシステイス、ロイコトゾーン、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門に属している。アピコンプレックス門に属する原虫は、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。

本研究では、アピコンプレックス門において保存されているプロテインキナーゼに焦点を当てる。本研究の目的は、アピコンプレックス門で保存されているプロテインキナーゼ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、新たな抗原虫薬開発へとつなが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、また、開発に有用な基礎的データを蓄積することにある。

3. 研究の方法

(1)原虫プロテインキナーゼの発現・精製及び機能解析

キナーゼの機能解析には大量の蛋白質が必要のため、小麦無細胞蛋白質合成系及び組換えバキュロウイルス系を用いてトキソプラズマ原虫及びマラリア原虫のプロテインキナーゼの発現及び精製を行った。

精製された原虫プロテインキナーゼの自己リン酸化能を $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{ATP}$ を用いて *in vitro* キナーゼアッセイによって評価した。

哺乳類細胞での原虫プロテインキナーゼの発現を解析するため、Flagエピトープ等との融合蛋白質の発現プラスミドを作製した。

原虫プロテインキナーゼに対する抗体を作製し、感染細胞中での蛋白の局在を解析した。

(2)原虫プロテインキナーゼの基質及び会合因子の探索

原虫プロテインキナーゼとその基質が物理的に会合することを考慮し、酵母two hybrid法による会合分子の探索を行った。

同定された会合分子との *in vitro*, *in vivo* での複合体形成をGST pull down法、免疫沈降法で確認した。

会合分子が原虫プロテインキナーゼの基質

であるかどうかを *in vitro* キナーゼアッセイで解析した。会合分子が基質の場合、リン酸化部位を同定し、そこに変異を導入した変異体を作製することによりリン酸化の生物学的意義を解析した。

会合分子と相互作用するプロテインキナーゼの活性最小部位を同定し、その部位に部位特異的変異を導入した。作製された変異体はコンフォメーションを保ちながらも会合分子との特異的な相互作用が不可能となる。

(3)プロテインキナーゼノックアウト原虫の作製及び性状解析

ローデント(マウス)マラリア原虫を使った組換えマラリア原虫作製系を使って、マラリア原虫プロテインキナーゼのノックアウト原虫の作製を試みた。

4. 研究成果

トキソプラズマ原虫及びマラリア原虫のプロテインキナーゼについて機能解析を行い、以下の研究成果を得た。

(1)トキソプラズマ原虫プロテインキナーゼ TgCDPKif3 (*Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3)

Ca^{2+} 濃度依存性であり、哺乳類には相同遺伝子がなく、植物型の CDPK ファミリーに属する TgCDPKif3 に着目した。GST と 6×His との融合蛋白質の形で組換えバキュロウイルス系を用いて発現させ、glutathione と Ni-NTA アガロースを用いて、TgCDPKif3 を含む融合蛋白質の精製に成功した。ここで精製した融合蛋白質を用いて、*in vitro* kinase assay を行った。TgCDPKif3 を餌(bait)として酵母 two hybrid 系において、その基質あるいは会合分子の探索を行った。この結果、TgCDPKif3 の基質の候補分子として、glideosome の構成する原虫蛋白質の1つである aldolase が見出された。TgCDPKif3 は *in vitro* で aldolase をリン酸化することが明らかとなった。また、哺乳類細胞において両蛋白質を過剰発現させ、免疫沈降を行ったところ、細胞内での両蛋白質の結合が確認された。

(2)マラリア原虫プロテインキナーゼ

PfPKA-C (*Plasmodium falciparum*
cAMP dependent protein kinase
catalytic subunit)

PKA は Ca^{2+} シグナルをはじめ、様々なシグナル伝達系に関わる非常に重要なプロテインキナーゼの1つであることが知られている。原虫類は進化学的には渦鞭毛藻類に近縁であるため、小麦無細胞蛋白質合成系が発現系として有効である。以下の3つの原虫プロテインキナーゼについてはGSTとの融合蛋白質の形で小麦無細胞蛋白質合成系を用いて発現させ、glutathione アガロースを用いてGST融合蛋白質の精製に成功した。本研究では、小麦無細胞蛋白質合成系を用いて精製されたPfPKA-Cと哺乳類のPKA-Cとの阻害薬への感受性について解析を行った。

PfPK2 (*Plasmodium falciparum* calcium
calmodulin dependent protein kinase)

Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼの相同遺伝子はマラリア原虫にはPfPK2の1遺伝子しか保存されていない。本研究では、小麦無細胞蛋白質合成系を用いて精製されたPfPK2のキナーゼ活性について、実際に Ca^{2+} 、カルモジュリンに依存性があるのかどうかを解析した。次に、 Ca^{2+} の特異的キレート剤であるEGTA、カルモジュリン拮抗薬、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼの阻害薬を使って、キナーゼ活性や赤血球侵入効率の変化について解析を行った。また、その局在についても調べた。

PfCDPK4 (*Plasmodium falciparum*
calcium dependent protein kinase 4)

CDPKファミリーに属するPfCDPK4に着目し、小麦無細胞蛋白質合成系を用いて精製されたPfCDPK4のキナーゼ活性について、実際に Ca^{2+} 依存性があるのかどうかを解析した。マウスマラリアの相同遺伝子であるPbCDPK4をノックアウトすると雄性ガメトサイトの鞭毛放出能がなくなることから、PfCDPK4についても雄性ガメトサイトの鞭毛放出に不可欠な役割と果たしていると考えられる。このことから、哺乳類から蚊への移行による環境

変化に対するPfCDPK4のキナーゼ活性の変化について解析を行った。また、その局在についても調べた。

この他、宿主細胞及びウイルスが保持するプロテインキナーゼとウイルス蛋白質との相互作用についても解析を行った。

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7件)すべて査読有。

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.** In press. (2009)

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.** In press. (2009)

Yamane D, Zahoor MA, Mohamed YM, Azab W, Kato K, Tohya Y, Akashi H. Inhibition of sphingosine kinase by bovine viral diarrhea virus NS3 is crucial for efficient viral replication and cytopathogenesis. **J Biol Chem.** 284:13648-13659. (2009)

Kobayashi K, Kato K (corresponding author), Sugi T, Yamane D, Shimojima M, Tohya Y, Akashi H. Application of retrovirus-mediated expression cloning for receptor screening of a parasite. **Anal Biochem.** 389:80-82. (2009)

Kato K (corresponding author), Sudo A, Kobayashi K, Tohya Y, Akashi H. Characterization of *Plasmodium falciparum* protein kinase 2. **Mol Biochem Parasitol.** 162:87-95. (2008)

Sudo A, Kato K (corresponding author),

Kobayashi K, Tohya Y, Akashi H. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* cyclic AMP dependent protein kinase and its mammalian homologue to the inhibitors. **Mol Biochem Parasitol.** 160:138-142. (2008)

Asai R, Kato A, **Kato K**, Kanamori Koyama M, Sugimoto K, Sairenji T, Nishiyama Y, Kawaguchi Y. Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is a virion tegument protein that dissociates from virions in a phosphorylation dependent process and phosphorylates the viral immediate early protein BZLF1. **J Virol.** 80: 5125-5134. (2006)

[学会発表](計 25 件)

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

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

小林郷介、**加藤健太郎**、竹前等、杉達紀、遠矢幸伸、明石博臣 "陰イオン性糖類による熱帯熱マラリア原虫侵入阻害機構の解明" 第 17 回分子寄生虫ワークショップ, 群馬, 2009.8

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

加藤健太郎、小林郷介、Kishor Pandey、竹前等、龔海燕、杉達紀、明石博臣 "レトロウイルスベクターを用いた原虫感染レセプタースクリーニング系の開発" 第 17 回分子寄生虫ワークショップ, 群馬, 2009.8

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

加藤健太郎、小林郷介、杉達紀、遠矢幸伸、明石博臣 "ガメトジェネシスの過程における熱帯熱マラリア原虫の PfCDPK4 の動向解析" 第 78 回日本寄生虫学会, 東京, 2009.3

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 と宿主細胞侵入の制御メカニズム" 第 78 回日本寄生虫学会, 東京, 2009.3

小林郷介、**加藤健太郎**、首藤篤史、杉達紀、下島昌幸、遠矢幸伸、明石博臣 "Plasmodium falciparum BAEBL とヘパラン硫酸プロテオグリカンの相互作用に関する研究" 第 78 回日本寄生虫学会, 東京, 2009.3

Kentaro Kato, Atsushi Sudo, Kyousuke Kobayashi, Yukinobu Tohya and Hiroomi Akashi "Characterization of *Plasmodium falciparum* protein kinase 2" American Society of Tropical Medicine and Hygiene 57th Annual Meeting, New Orleans, USA, 2008.11

Yamane D, Zahoor MA, **Kato K**, Tohya Y, Akashi H. "Interaction of BVDV NS3 with sphingosine kinase 1 is crucial for efficient viral replication and cytopathogenesis" 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, U.S.A., 2008.10

山根大典、M. Atif Zahoor、**加藤健太郎**、遠矢幸伸、明石博臣 "スフィンゴシンキナーゼ活性が牛ウイルス性下痢ウイルス複製に与える影響の解析" 第 56 回日本ウイルス学会, 岡山, 2008.10

小林郷介、**加藤健太郎**、首藤篤史、杉達紀、下島昌幸、遠矢幸伸、明石博臣 "Plasmodium falciparum BAEBL は赤血球表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合する" 第 146 回日本獣医学会, 宮崎, 2008.9

加藤健太郎、首藤篤史、小林郷介、杉達紀、遠矢幸伸、明石博臣 "宿主移動に伴うマラリア原虫プロテインキナーゼ

- PfCDPK4の機能変化" 第146回日本獣医学会, 宮崎, 2008.9
- 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プロテインキナーゼの機能解析と基質探索の展望" 第16回分子寄生虫ワークショップ, 群馬, 2008.8
- 小林郷介、**加藤健太郎**、首藤篤史、杉達紀、下島昌幸、遠矢幸伸、明石博臣 "*Plasmodium falciparum* BAEBLを用いた新規レセプタースクリーニング系の確立と新規結合分子の同定" 第16回分子寄生虫ワークショップ, 群馬, 2008.8
- 加藤健太郎**、首藤篤史、小林郷介、杉達紀、遠矢幸伸、明石博臣 "熱帯熱マラリア原虫プロテインキナーゼPfCDPK4のリン酸化の感染環における役割" 第77回日本寄生虫学会, 長崎, 2008.4
- 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非構造蛋白質NS3によるスフィンゴシンキナーゼ活性制御機構の解析" 第55回日本ウイルス学会, 北海道, 2007.10
- 加藤健太郎**、首藤篤史、小林郷介、遠矢幸伸、明石博臣 "マラリア原虫プロテインキナーゼPfPK2の機能解析" 第144回日本獣医学会, 北海道, 2007.9
- 首藤篤史、**加藤健太郎**、小林郷介、遠矢幸伸、明石博臣 "マラリア原虫のcAMP-dependent protein kinaseの機能解析" 第144回日本獣医学会, 北海道, 2007.9
- 21 首藤篤史、**加藤健太郎**、小林郷介、遠矢幸伸、明石博臣 "熱帯熱マラリア原虫のPKAの発現及び機能解析" 第15回分子寄生虫学ワークショップ, 群馬, 2007.7
- 22 **加藤健太郎**、首藤篤史、小林郷介、遠矢幸伸、明石博臣 "熱帯熱マラリア原虫のCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼの機能解析" 第15回分子寄生虫学ワークショップ, 群馬, 2007.7
- 23 **加藤健太郎**、首藤篤史、小林郷介、遠矢幸伸、明石博臣 "熱帯熱マラリア原虫プロテインキナーゼの機能解析" 第5回感染症若手研究者沖縄フォーラム, 沖縄, 2007.2
- 24 首藤篤史、**加藤健太郎**、小林郷介、遠矢幸伸、明石博臣 "熱帯熱マラリア原虫のcAMP-dependent protein kinase (PfPKA)の機能解析" 第76回日本寄生虫学会, 大阪, 2007.3
- 25 **加藤健太郎**、首藤篤史、小林郷介、遠矢幸伸、明石博臣 "*Plasmodium falciparum* protein kinase 2 (PfPK2)の機能解析" 第76回日本寄生虫学会, 大阪, 2007.3
- 〔図書〕(計3件)
- 加藤健太郎 (共著)、チクサン出版社、獣医微生物学実験マニュアル、16-26 (2009)
- 加藤健太郎 (共著)、朝倉書店、動物微生物学、86-94, 258-271 (2008)
- 加藤健太郎 (共著)、チクサン出版社、新明解 獣医学辞典 (2008)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計1件)
- 名称: 熱帯熱マラリア原虫の雄性ガメトサイトマーカー
- 発明者: 加藤健太郎
- 権利者: 同上
- 種類: 特許権
- 番号: 特願2009-027156
- 出願年月日: 2009年2月9日
- 国内外の別: 国内
- 〔その他〕
- 東京大学農学生命科学研究科プレスリリース
- "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制御機構の解析"
- 発表者: 山根大典、ムハマド・A・ザフル、ヤシル・M・モハメド、ワリッド・アザブ、**加藤健太郎**、遠矢幸伸、明石博臣
- 2009年5月19日
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。