

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：31603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07092

研究課題名(和文)クルーズトリパノソーマシストの生命基盤の解明と慢性シャーガス病治療への応用

研究課題名(英文) Induction of a cyst-like form of *Trypanosoma cruzi*

研究代表者

奈良 武司 (Nara, Takeshi)

医療創生大学・薬学部・教授

研究者番号：40276473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シャーガス病は、寄生原虫クルーズトリパノソーマを病原体とする感染症で、慢性化を特徴とする。申請者らは、レクチンの一種コンカナバリンA (ConA) を含む培地でクルーズトリパノソーマ上鞭毛期型(昆虫型)を培養すると、原虫が嚢子(cyst)に類似した形態となり、内部に多数の娘原虫が形成されることを明らかにした。原虫の核やミトコンドリアなどの細胞内小器官は嚢子壁で形成され、嚢子内腔で個々の原虫が形成された。また、嚢子内に形成された原虫は哺乳類細胞に感染できることが明らかとなった。メタボローム解析の結果、ConAで誘導された嚢子の代謝活性は低下しており、休眠型の性質を持つことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シャーガス病における慢性化の機序として、これまでに細胞内寄生型amastigoteの中には「分裂しない」原虫が出現し、これが薬剤耐性や長期生存の原因となっている可能性が示唆されている(DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34039.001>, 2018)。本研究で見出された嚢子型では解糖中間代謝産物の蓄積が認められ、休眠に近い代謝活性状態にあると考えられる。本研究の成果は、シャーガス病の慢性化の新たな機序として原虫の休眠現象を強く示唆するものであり、その分子基盤を明らかにすることによって新たな創薬標的の創出が期待できる点で、大きな学術的・社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Trypanosoma cruzi is a parasitic protist and causes Chagas disease. Chronic phase is characteristic to Chagas disease, like tuberculosis and toxoplasmosis, of which the pathogens become a dormant form. Here we demonstrate “a cyst-like form” of *T. cruzi* induced by treatment with concanavalin A (ConA). In the presence of ConA, epimastigote, an insect stage of *T. cruzi*, became swollen by enlargement of vacuole, leading to the formation of cyst wall. Cellular organelles, like nuclei, mitochondria, and flagella, multiplied synchronously within the cyst wall and then newly formed, motile organisms budded inside the vacuolar cavity. The daughter parasites survived at least 2 weeks in this form and, notably, were infective to the mammalian cells. Metabolomic analysis showed accumulation of glycolytic intermediates, suggesting the arrest of energy metabolism. Our data suggest that dormancy *T. cruzi* may be associated with long-lasting persistence of the parasites in chronic Chagas disease.

研究分野：寄生虫学

キーワード：クルーズトリパノソーマ シャーガス病 シスト形成 休眠

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シャーガス病は慢性化が特徴であり、数年～数十年にわたる無症状期間を経て、感染者のおよそ30～40%で心筋症、巨大結腸・巨大食道を発症し、突然死やQOLの重大な低下を引き起こす。また、無症状感染者や慢性期患者は血清学的検査では陽性であり、これは病原原虫クルーズトリパノソーマの持続感染を意味する。しかし、なぜ原虫が感染し続けるのかを説明することは容易ではない。なぜなら、原虫が増殖(活動)し続けるということは免疫系に捕捉されて完全に排除されるか、宿主を死に至らしめるかの、どちらかになるからである。事実、長期感染を起こす他の組織寄生性の病原体は必ず休眠ステージを持つ。例えば、結核菌では分裂休止菌が、トキソプラズマでは原虫自身の膜に包まれた嚢子(シスト)が、それに該当する。つまり、クルーズトリパノソーマの巧みな細胞侵入機構や免疫回避機構が次第に明らかになりつつある現在も、これが長期間排除されない理由は未解決のままとなっている(*Cell Microbiol* 14, 2012)。

今から50年前、Iraluは尿素分解酵素ウレアーゼを培養液に添加することによってクルーズトリパノソーマ昆虫型から嚢子様構造を誘導できると報告したが(*Nature* 204, 1964) 続く報告はなかった。申請者らはこの先駆研究に着目して再現に取り組み、ウレアーゼではなくこれに混入していたレクチンの一種コンカナバリン A (Con A) が嚢子を誘導すること、ConAは原虫のチュープリンおよびシステインプロテアーゼの一種クルジパインに結合することを見いだした(科学研究費補助金挑戦的萌芽研究成果報告書、16K15268)。

### 2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究を進展させ、申請者らが誘導に成功した嚢子について、その内部構造、代謝基盤、誘導因子等を解析し、クルーズトリパノソーマ嚢子の休眠型としての特徴を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* Tulahuen株および赤色蛍光タンパクDsRedを恒常的に発現する同株にの上鞭毛期型(epimastigotes)は、ATCC 1029 LIT medium (LIT培地)を用いて26°Cで継代培養した。*T. cruzi* Tulahuen株の哺乳類型については、マウス由来SWISS-3T3 albino細胞との共培養下で、10%ウシ胎児血清(FBS)を含むMEM培地(MEM/10% FBS)を用いて37°Cで継代培養した。

#### 3.2. シスト誘導

$2 \times 10^6$ /mlの*T. cruzi* 上鞭毛期型を、5  $\mu$ g/ml コンカナバリン A (ConA、富士フィルム和光純薬) 1% ウシ胎児血清(FBS) 10  $\mu$ g/ml heminを含むtrypticase soy broth (日本ベクトン・ディッキンソン)培地(以下TSB培地)で、26°Cで培養した。

#### 3.3. 電子顕微鏡観察

原虫を定法に従って固定し、超薄切片を作成した。超薄切片をクエン酸鉛および酢酸ウラニルで固定後、透過型電子顕微鏡(日立H-7100、日立製作所)を用いて75 kVで観察した。

#### 3.4. 免疫蛍光染色

DsRed発現*T. cruzi*上鞭毛期型を5  $\mu$ g/ml ConAを含むTSB培地で培養した。原虫を4%パラホルムアルデヒドで固定後、1% Triton X-100処理を行ない、10%ウシ胎児血清(FBS)/PBSを用いてブロッキングを行なった。鞭毛の染色にはトリパノソーマ類の特異的鞭毛タンパクPFR1に対するウサギ抗血清を用い、核およびキネトプラストの染色にはHoechst33342を用いた。封入後、蛍光顕微鏡(Axio Imager 2、カールツァイス)を用いて観察した。

#### 3.4. メタボローム解析

$2 \times 10^6$ /mlの*T. cruzi* 上鞭毛期型を5  $\mu$ g/ml ConAを含むTSB培地で1、2、4日間培養し、細胞を回収した。細胞を破碎して粗抽出液を調製し、CE-MS装置を用いた比較メタボローム解析を行なった。

### 4. 研究成果

#### 4.1. 嚢子における娘細胞形成

トリパノソーマ類の分裂様式は基本的に2分裂であるが、Iralu(1964)らの記述は孢子虫類に見られる内生出芽に類似する。これまで鞭毛および核を蛍光染色しシスト形成における形態変化を継時的に観察したところ、ConA処理48時間後に内部に空胞を保持するようになった原虫では、細胞分裂に先立って細胞質で核、キネトプラスト、および鞭毛の分裂が起こり、ConA処理7日目には多数(～10本)の鞭毛様構造が空胞内腔でゆらゆらと動く様子が観察されてい

る。そこで本研究では、電子顕微鏡を用いて娘細胞の形成過程を詳細に観察した。蛍光染色を用いた観察同様、嚢子壁でオルガネラの分裂が起こり、最初に鞭毛が空胞内腔に出芽する様子が観察された。出芽が伸長するにつれて、キネトプラストおよび核を含むようになり、娘細胞が形成された。娘細胞同士は部分的に結合しているものが多数を占めていた。原虫は基本的に単一の核、鞭毛、キネトプラストを有するが、娘細胞の中には複数の鞭毛を持つものが観察された。免疫蛍光染色を用いてオルガネラの分裂を再解析したところ、オルガネラの分裂は必ずしも同調せず、鞭毛+キネトプラストの分裂に比して核の分裂が遅れる傾向が認められた。

娘細胞の発育期型については、形態観察の結果からは鑑別できなかったが、予備的な実験において嚢子を哺乳類細胞培養系に加えると感染が成立することから（未発表）、終末発育型に近い性質をもつ原虫が嚢子内で分化する可能性が示唆された。

#### 4.2. 嚢子の代謝基盤

これまでに実施したメタボローム解析から、ConA 添加培地で培養後 4 日目においてアデニン量が著しく上昇（60 倍以上）すること、ATP/ADP 比が著しく低下すると同時に AMP が増加することを見出している。この結果は、*T. cruzi* 嚢子において ATP 合成能が低下していることを示唆している。その原因を探るために、解糖系の中間代謝産物について再解析した結果、ConA 添加培地で培養後 4 日目にはホスホフルクトキナーゼ（PFK）の基質であるフルクトース 1,6-ビスリン酸が 100 倍以上蓄積することが明らかとなった。PFK は AMP によって活性化するアロステリック酵素であるため、AMP 濃度の上昇とフルクトース 1,6-ビスリン酸の蓄積（PFK 活性の阻害）には矛盾があるが、その生理機構の解明には至っていない。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nara Takeshi, Nakagawa Yukari, Tsuganezawa Keiko, Yuki Hitomi, Sekimata Katsuhiko, Koyama Hiroo, Ogawa Naoko, Honma Teruki, Shirouzu Mikako, Fukami Takehiro, Matsuo Yuichi, Inaoka Daniel Ken, Kita Kiyoshi, Tanaka Akiko	4. 巻 16
2. 論文標題 The ubiquinone synthesis pathway is a promising drug target for Chagas disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0243855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nurwidya Fariz, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Zinc finger E box binding homeobox 1 <sc>(ZEB1)</sc> plays a crucial role in the maintenance of lung cancer stem cells resistant to gefitinib	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1536 ~ 1548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Tsuge C, May B, Sato T, Kido Y, Nara T, Aoki T, Honma T, Tanaka A, Inoue M, Matsuoka S, Michels PAM, Watanabe YI, Moore AL, Harada S, Kita K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Discovery of trypanocidal coumarins with dual inhibition of both the glycerol kinase and alternative oxidase of Trypanosoma brucei brucei.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 13002-13013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901342R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Shiba Tomoo, Inaoka Daniel Ken, Takahashi Gen, Tsuge Chiaki, Kido Yasutoshi, Young Luke, Ueda Satoshi, Balogun Emmanuel Oluwadare, Nara Takeshi, Honma Teruki, Tanaka Akiko, Inoue Masayuki, Saimoto Hiroyuki, Harada Shigeharu, Moore Anthony L., Kita Kiyoshi	4. 巻 1860
2. 論文標題 Insights into the ubiquinol/dioxygen binding and proton relay pathways of the alternative oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 375 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2019.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiba Tomoo, Inaoka Daniel Ken, Takahashi Gen, Tsuge Chiaki, Kido Yasutoshi, Young Luke, Ueda Satoshi, Balogun Emmanuel Oluwadare, Nara Takeshi, Honma Teruki, Tanaka Akiko, Inoue Masayuki, Saimoto Hiroyuki, Harada Shigeharu, Moore Anthony L., Kita Kiyoshi	4. 巻 1860
2. 論文標題 Insights into the ubiquinol/dioxygen binding and proton relay pathways of the alternative oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 375 ~ 382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabo.2019.03.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamashita Yuri, Nakada Satoshi, Yoshihara Toshinori, Nara Takeshi, Furuya Norihiko, Miida Takashi, Hattori Nobutaka, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 8
2. 論文標題 Perlecan, a heparan sulfate proteoglycan, regulates systemic metabolism with dynamic changes in adipose tissue and skeletal muscle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-25635-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 奈良武司 (共著) . 永宗 喜三郎、脇 司、常盤 俊大、島野 智之編 .	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 168
3. 書名 寄生虫のはなし	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三浦 芳樹  (Miura Yoshiki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	角田 宗一郎  (Kakuta Soichiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関