

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670199

研究課題名(和文)トキソプラズマ原虫の潜伏感染誘導トリガー因子の同定

研究課題名(英文)Identification of trigger factor for the differentiation of Toxoplasma bradyzoite

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・准教授

研究者番号：30401178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：全ゲノム遺伝子解析を行うことで、トキソプラズマ原虫の潜伏感染誘導関連因子の同定に成功した。マウスの脳内にトキソプラズマのシストを形成させる実験系の確立に成功した。さらに、この系を用いてシストへの薬剤効果の解析を行った。トキソプラズマ原虫の休眠型虫体への移行時に発現する遺伝子のプロモーターの下流に発光蛋白質遺伝子を挿入した組換え原虫を作製した。この原虫の発光の有無を指標として、休眠型への移行を抑制する薬剤のスクリーニング系を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in the detection of parasite factor associated with dormant differentiation by the whole genome sequence analyses. We established the experimental system that Toxoplasma cysts can be formed in mice brain. The effects of drugs were analyzed using this system. The recombinant parasite was manufactured which have the luminescent gene downstream of the promoter of gene associated with dormant differentiation. The drug screening system which selects the inhibitors of dormant differentiation by the luminescent activity was established.

研究分野：寄生虫学

キーワード：トキソプラズマ 潜伏感染 全ゲノム遺伝子解析 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

トキソプラズマ原虫は、マラリア原虫等と同じくアピコンプレックス門に属する原虫であり、猫科動物を終宿主とする人獣共通感染症である。世界中で発症が見られ、ヒトでも高い感染率を示している。妊婦が感染すると、流産や胎児の脳症、痙攣、水頭症、頭蓋内石灰化等を起こす。健康な成人では通常無症状であるが、胎児・幼児、臓器移植やエイズの患者など、免疫抑制状態にある場合には重症化して死に至ることもあり、重篤な日和見感染症である。重症化した場合には、脳炎や神経系疾患をおこしたり、肺・心臓・肝臓・眼球などの臓器を破壊する。予防するためのワクチンはない。2012年9月23日に先天性トキソプラズマ&サイトメガロウイルス感染症患者会(トーチの会)が設立され、NHKでもその被害が取り上げられた。近年の食習慣の変化に伴い、先天性トキソプラズマ症が拡大し、思春期に症状が出ることもあることから無自覚のものも含めると我が国の新生児において年数百件の被害があると推定されている。このような状況の中、研究代表者はトキソプラズマ症の根治を困難にしている最たる原因と考えられる潜伏感染への移行に関わるトリガー因子の同定、休眠型の虫体が充填しているシストへの宿主免疫系や薬剤からの攻撃を阻む強固なシスト壁の構造解析を通じて、この潜伏感染誘導機構について解析を行うことが、必須であるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、トキソプラズマの潜伏感染への誘導トリガー因子の同定、休眠型虫体のシスト壁の構造解析を通じて、現在ほとんど明らかとなっていない潜伏感染誘導機構の解明を行うことで、バイオマーカーを用いた慢性感染の診断キットやシスト壁を標的とする薬剤の開発を目指した基礎研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 全ゲノム遺伝子解析による潜伏感染誘導関連因子の同定

化学変異原の ENU を投与後、1NM-PP1 などの栄養型のトキソプラズマ原虫の虫体を休眠型へと誘導する薬剤を用いて、この薬剤の存在下で長期間培養すること

で耐性原虫の作出とそれらのクローン化を行った。

作出された薬剤耐性クローンの全ゲノム遺伝子解析を行い、特に休眠型への移行シグナルに関わると考えられる原虫プロテインキナーゼなどの予想アミノ酸配列について親株との比較解析を行った。

比較ゲノム解析によって明らかとなった変異アミノ酸をレスキューした原虫を作製し、その表現型が復帰するかを解析する。また、その変異部が休眠型への移行シグナルに関与している可能性があるかを検討した。

休眠型への移行の鍵となる遺伝子を制御するプロモーターの下流に発光蛋白質遺伝子を挿入することで、休眠型への移行が可視化できるようにした。

(2) 休眠型虫体に対する薬剤開発

マウスにトキソプラズマ原虫を感染させることで主にマウスの脳内に休眠型虫体(ブラディゾイト)が充填されたシストを形成させた。

この動物感染実験系を用いて、薬剤の休眠型虫体への影響を解析した。

4. 研究成果

全ゲノム遺伝子解析を行うことで、トキソプラズマ原虫の潜伏感染誘導関連因子の同定に成功した。

マウスの脳内にトキソプラズマのシストを形成させる実験系の確立に成功した。さらに、この系を用いてシストへの薬剤効果の解析を行った。

トキソプラズマ原虫の休眠型虫体への移行時に発現する遺伝子のプロモーターの下流に発光蛋白質遺伝子を挿入した組換え原虫を作製した。この原虫の発光の有無を指標として、休眠型への移行を抑制する薬剤のスクリーニング系を開発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7件)

以下の全ての雑誌論文で査読有り。

Kato K (corresponding author), Ishiwa A. Roles of carbohydrates in the

infection strategies of enteric pathogens. *Trop Med Health*. 43: 41-52. (2015) doi: 10.2149/tmh.2014-25.

Sugi T, Kawazu SI, Horimoto T, Kato K (corresponding author). A single mutation in the gatekeeper residue in TgMAPKL-1 restores the inhibitory effect of a bumped kinase inhibitor on the cell cycle. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 5:1-8. (2014) doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.12.001. **日経産業新聞記事掲載 (2015年8月5日8面)**

Sugi T, Masatani T, Murakoshi F, Kawazu S, Kato K (corresponding author). Microplate assay for screening *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation with DUAL luciferase assay. *Anal Biochem*. 464C:9-11. (2014) doi: 10.1016/j.ab.2014.06.018.

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.

Sugi T, Kato K (corresponding author). Signaling cascade and stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. *Jpn J Vet Parasitol*. 12: 73-78. (2013)

Iwanaga T, Sugi T, Kobayashi K, Takemae H, Gong H, Recuenco FC, Ishiwa A, Horimoto T, Akashi H, Kato K (corresponding author). Function of *Plasmodium falciparum* cyclin-dependent kinases in erythrocytic schizogony. *Parasitol Int*. 62: 423-430. (2013) doi: 10.1016/j.parint.2013.05.003.

Malaria Nexus 記事掲載 (2013年6月6日)

Sugi T, Kobayashi K, Gong H, Takemae H, Ishiwa A, Iwanaga T, Horimoto T, Akashi H, Kato K (corresponding author). Identification of mutations in TgMAPK1

of *Toxoplasma gondii* conferring the resistance to 1NM-PP1. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 3: 93-101. (2013) doi: 10.1016/j.ijpddr.2013.04.001. **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5月29日)、日経産業新聞記事掲載 (2013年5月31日9面)、十勝毎日新聞記事掲載 (2013年6月3日22面)、北海道新聞記事掲載 (2013年6月8日朝刊25面)**

[学会発表] (計19件)

村田 優穂、高野 量、五十嵐 慎、加藤 健太郎「トキソプラズマのシスト形成に寄与する因子の探索」第85回日本寄生虫学会大会、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)、2016年3月

杉 達紀、Ma Yanfen、Tomita Tadakimi、Yakubu Rama、Han Bing、Tu Vincent、加藤 健太郎、河津 信一郎、Weiss Louis「Glycogen Metabolism in *Toxoplasma gondii*: Storage, Regulation, and Effects on Parasite Growth」第85回日本寄生虫学会大会、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)、2016年3月

Oluyomi S. Adeyemi, Kentaro Kato「Metal nanoparticles demonstrated anti-proliferative activity against *Toxoplasma gondii* in vitro」第85回日本寄生虫学会大会、宮崎市民プラザ(宮崎県・宮崎市)、2016年3月

加藤 健太郎「原虫感染における糖鎖の役割と抗原虫薬としての可能性」BMB2015、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)、2015年12月

村田 優穂、杉 達紀、加藤 健太郎「トキソプラズマの中間宿主体内におけるステージ変換に影響を与える化合物の探索」第158回日本獣医学会、北里大学(青森県・十和田市)、2015年9月

村田 優穂、加藤 健太郎「トキソプラズマ原虫の潜伏感染の成立に関与する因子の探索」第23回分子寄生虫学ワークショップ・第13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)、2015年8月

イトリアン マカランタ、加藤 健太郎

「Characterization of *Toxoplasma gondii* MIC10 using type II ku80 hxgprt strain」第23回分子寄生虫学ワークショップ・第13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)、2015年8月
加藤 健太郎「感染における原虫と宿主細胞の相互作用」シンポジウム「若手獣医出身者による最先端感染症研究」、東京大学(東京都・文京区)、2015年6月
杉 達紀、Tomita Tadakimi、Ma Yan Fen、Yakubu Rama、**加藤 健太郎**、河津 信一郎、Weiss Louis 「CRISPR-based simple Insertional KO streamline with *T. gondii* ME49 strain」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
村田 優穂、杉 達紀、**加藤 健太郎**「トキソプラズマの潜伏感染を抑制する化合物の探索」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、杉達紀、竹前等、高野量「トキソプラズマ原虫の CaMK 様酵素の機能解析」第55回日本熱帯医学会大会、第29回日本国際保健医療学会学術大会、東京女子医科大学・国立国際医療研究センター(東京都・新宿区)、2014年11月
杉 達紀、堀本泰介、明石博臣、河津信一郎、**加藤 健太郎**「トキソプラズマの潜伏感染および急性感染を制御するシグナル経路の解析」第157回日本獣医学会、北海道大学(北海道・札幌市)、2014年9月
杉 達紀、正谷達膳、村越ふみ、河津信一郎、**加藤 健太郎**「DUAL - LUCIFERASE を利用したトキソプラズマ潜伏感染の高効率評価系」第157回日本獣医学会、北海道大学(北海道・札幌市)、2014年9月
村田優穂、杉達紀、**加藤健太郎**「トキソプラズマ潜伏感染に効く化合物探索に向けたレポーター原虫の作成」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8月
杉達紀、竹前等、石和玲子、高野量、レクエンコ・フランセス、村越ふみ、堀本泰介、明石博臣、**加藤健太郎**「誘導下 TgMAPK1 発現原虫を用いたトキソプラズ

マ細胞分裂制御の解析」第83回日本寄生虫学会、愛媛大学(愛媛県・松山市)、2014年3月

杉 達紀、正谷達膳、竹前 等、玄 学南、堀本泰介、**加藤健太郎**「迅速診断法 AlphaScreen 活用に向けた Reverse sandwich ELISA のトキソプラズマ原虫抗血清検出への適用」第156回日本獣医学会、岐阜大学(岐阜県・岐阜市)、2013年9月

杉 達紀、堀本泰介、**加藤健太郎**「トキソプラズマ原虫の細胞分裂、分化を調節する TgMAPK1 の制御機構の解明」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

Kentaro Kato, Tatsuki Sugi, Taisuke Horimoto, Hiroomi Akashi. 「Characterization of a *Toxoplasma gondii* calcium calmodulin-dependent protein kinase homolog.」12th International Congress on Toxoplasmosis, オックスフォード大学(イギリス・オックスフォード)2013年6月

Tatsuki Sugi, Hitoshi Takemae, Akiko Ishiwa, Taisuke Horimoto, Hiroomi Akashi, **Kentaro Kato**. 「Characterization of 1NM-PP1 resistant *Toxoplasma gondii* with mutation at TgMAPK1.」12th International Congress on Toxoplasmosis, オックスフォード大学(イギリス・オックスフォード)2013年6月

〔図書〕(計5件)

加藤健太郎 公益社団法人 農林水産・食品産業技術振興協会「JATAFF ジャーナル」 農業のフロント Vol.3, No. 9, 2015, 62(51)

加藤健太郎 公益社団法人 農林水産・食品産業技術振興協会「JATAFF ジャーナル」 食品媒介性原虫感染症に対する新規薬剤の技術開発 Vol.3, No. 4, p.5-9 2015, 51(5-9)

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)
杉達紀、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」 DUAL-LUCIFERASE を利用したトキソプラズマ原虫潜伏感染評価方法、2014、179 (107-109)
杉達紀、**加藤健太郎**、三恵社、「寄生虫研究 材料と方法」 無作為突然変異と全ゲノムシーケンスを用いたトキソプラズマ原虫の薬剤耐性解析、2013、166 (97-99)

〔産業財産権〕
出願状況（計1件）

名称：抗原虫薬のスクリーニング方法及び組換えトキソプラズマ株
発明者：**加藤健太郎**、杉達紀、正谷達膳
権利者：国立大学法人帯広畜産大学、国立大学法人鹿児島大学
種類：特願
番号：2014-109262
出願年月日：2014年5月27日
国内外の別：国内

〔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。