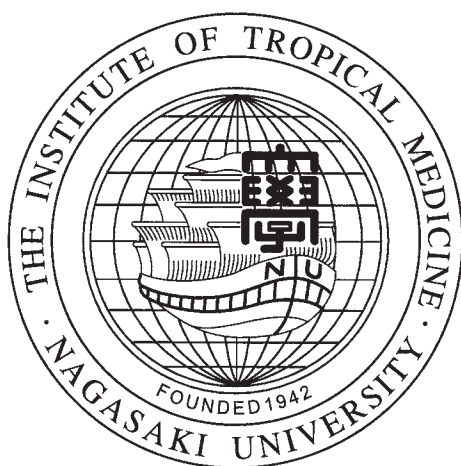


熱帯医学研究拠点共同研究報告集

令和4年度
(2022)



長崎大学熱帯医学研究所
(全国共同利用研究所)

はじめに

長崎大学熱帯医学研究所
所長 金子 修

熱帯地域を中心とした開発途上国では、依然として古典的な熱帯性感染症が流行し、加えてウイルス性出血熱や新型コロナウイルス感染症などの新興感染症が保健衛生のみならず社会・経済分野においても国内外で重大な脅威となっています。加えて近年は、非感染性疾患も問題となってきています。先進諸国あるいは国際機関、民間支援機関などは多大な投資を三大感染症（HIV/AIDS、結核、マラリア）や顧みられない熱帯病などに対して実施し、その結果、いくつかの熱帯病・新興感染症については明瞭な減少も見られるようになりました。しかし、多くの熱帯病・新興感染症の発生状況や社会背景は、より多様化し複雑化してきています。異常気候、熱帯雨林の環境破壊、難民の増加などの諸問題がさらに感染症の発生状況の混迷度を高め、加えて令和 2 年度から始まった新型コロナウイルスのパンデミックにより、これまで順調に進展してきた優良な国際プログラムを含め、多くの国々で感染症対策やグローバルヘルス戦略の推進に多大な障害が発生しました。私の専門であるマラリアについても、パンデミックによる医療崩壊により、減少していた世界の感染者数が 20 年前のレベルまで戻ってしまいました。

長崎大学熱帯医学研究所は熱帯医学及び国際保健における先導的研究、及び、それらの応用による熱帯病の防圧と健康増進への国際貢献、それらにかかわる研究者と専門家の育成をミッションとし、アジア・アフリカ感染症研究施設（ケニア拠点、ベトナム拠点）などの研究基盤を背景として国内外の多様な領域の研究者とともに熱帯地域の現場に根ざした研究を遂行しています。特に、文部科学省共同利用・共同研究拠点「熱帯医学研究拠点」事業では、以下にあげる活動を通して、熱帯医学領域の学術の向上と世界的な感染症対策へ寄与することを目標とします。

1. 国内外の研究基盤を活用した共同研究

先端的研究設備・機器やアジア・アフリカ感染症研究拠点等の本研究所が有する研究基盤を活用し、熱帯病・新興感染症の臨床疫学、公衆衛生学、微生物病学などをベースにした、または、グローバルヘルス領域の基礎・応用研究プロジェクトを全国に公募し、研究所内外の専門家により構成される運営委員会により採択された活動を支援します。なお、このプロジェクトには現地の研究者も参加できます。

2. 研究集会

関連研究の情報交換や共同研究の促進のための国際的な研究会や、研究技術の普及のための研修会を、オンライン開催を含めて公募し支援します。

3. リソースセンター

研究や教育に資するため、病原体や遺伝情報、標本、文献資料の集積保存、全国配布を

行います。

4. 熱帯医学ミュージアム

共同利用・共同研究などで得られた知識や科学的新知見を社会に還元するため、サイエンスコミュニケーション、情報発信の中核を担います。

本事業でも国外での共同研究のハードルが高くなっていましたが、令和4年度は、一部の地域へは渡航制限が続いたものの、国外出張のハードルが下がり、研究再開の年となりました。本拠点が提供する共同利用・共同研究基盤が、日本の学術コミュニティをさらに活性化し、開発途上国ひいては世界の熱帯病・新興感染症制御に資する新たな知と技の創造、また、グローバルヘルスの向上につながることを祈念しております。

目 次

第1部 一般共同研究

1. 赤痢アメーバ由来レクチン Igl の結晶構造解析
代表者：海野 英昭（長崎大学大学院 工学研究科 准教授） 1
2. トランスポゾンシーケンシングにより選択したビブリオ バルニフィカスの生体内増殖必須遺伝子の機能解析
代表者：柏本 孝茂（北里大学 獣医公衆衛生学 准教授） 7
3. 赤痢アメーバレクチンの糖鎖認識特異性の解明
代表者：新地 浩之（鹿児島大学 助教） 10
4. サルモネラ全身感染メカニズムの解明と薬剤耐性菌治療への応用
代表者：羽田 健（北里大学薬学部 講師） 14
5. **The Genetic diversity of Plasmodium malariae and Plasmodium ovale from Republic of Congo**
代表者：RICHARD CULLETON（Ehime University, Professor） 18
6. 集団食中毒事例から分離されたナグビブリオのゲノム特性と病原性解析
代表者：森田 昌知（国立感染症研究所 主任研究官） 22
7. ヒト住血吸虫に対する中間宿主巻貝の感染耐性の理解に向けて
代表者：黒田 玲子（中部大学先端研究センター 特任教授） 27
8. 肝内型マラリア原虫における脂質分子リクルート機構の解明
代表者：荒木 球沙（国立感染症研究所 任期付研究員） 32
9. ポストコロナ時代の新しい近接性：共生のための環境デザイン
代表者：松本 文夫（東京大学総合研究博物館 特任教授） 36
10. 熱帯熱マラリアのニーマンピック C1 様受容体の機能解析
代表者：早川 枝李（自治医科大学医動物学 助教） 41
11. トリパノソーマ科原虫が持つ変異型オートファジー関連因子 ATG12 結合系の機能解析と生理学的意義の解明
代表者：坂本 寛和（千葉大学大学院医学研究院 特任助教） 47
12. 熱帯熱マラリア原虫ガメトサイト期における原虫タンパク質輸送機構の解析
代表者：入子 英幸（神戸大学大学院 保健学研究科 准教授） 54
13. 新規バベシア原虫赤血球修飾分子 BbDnaK の局在・機能解析
代表者：麻田 正仁（帯広畜産大学 原虫病研究センター 准教授） 58
14. **Pathogenomic and functional analysis to unravel the pathogenic potential of epidemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources**
代表者：Dr Krishna Kumar Ballamoole（Division of Infectious Diseases Nitte University Centre for Science Education & Research, Nitte (Deemed to be University), Associate Professor） 62
15. 放射線グラフト重合技術を活用した抗ウイルス性銀担持繊維の開発
代表者：保科 宏行（量子科学技術研究開発機構 主幹研究員） 70

16. Discovery of antimalarial drug targeting mitochondrial parasites from marine-associated bacteria	
代表者：Josephine Elizabeth Siregar (Eijkman Research Center for Molecular Biology, National Research and Innovation Agency, Researcher)	75
17. 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染後に出現する抗体が認識するウイルス抗原およびヒトタンパク質についての研究	
代表者：大山 要 (長崎大学病院薬剤部 教授)	92
18. Evaluation of humoral immune response induced by SARS-CoV-2 natural infection and vaccine, and identification of severe COVID-19 predictors	
代表者：Shyam Prakash Dumre (Central Department of Microbiology, Tribhuvan University, PhD, Associate Professor)	96
19. マラリア原虫メロゾイトの滑走運動に関わる分子の同定	
代表者：矢幡 一英 (愛媛大学 PROS 寄生病原体学部門 准教授)	128
20. Seroepidemiology and molecular characterization of Yellow fever, Dengue and Zika virus Infection in the Democratic Republic of the Congo.	
代表者：Steve Ahuka Mundeke. (Institut National de Recherche Biomédicale (INRB)/ Head of Virology Department, Professor)	134
21. ヒト iPS 由来肝細胞および肝オルガノイドを用いた熱帯熱マラリア原虫の感染特性の解析	
代表者：片上 幸美 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子解析学 客員研究員)	145
22. マラリア原虫感染による赤血球膜脂質構成変化のナノスケールレベル解析	
代表者：藤田 秋一 (鹿児島大学共同獣医学部 教授)	153
23. 原虫に共生するウイルスおよびウイルス・原虫間相互作用に関する因子の探索	
代表者：七戸 新太郎 (大阪大学微生物病研究所 助教)	159
24. 熱帯由来感染症に対する新薬開発を指向した微生物二次代謝産物の網羅的探索および単離・構造決定	
代表者：荒川 賢治 (広島大学大学院統合生命科学研究所 准教授)	167
25. マンソン住血吸虫のミトコンドリア硫黄代謝に関する研究	
代表者：河津 信一郎 (帯広畜産大学 原虫病研究センター 教授)	173

第2部 研究集会

1. 医学研究のための倫理に関する国際セミナー	
代表者：Nguyen Tien Huy (長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科 准教授)	181
2. マラリア対策に資する研究手法・機材開発の研究集会：媒介蚊に係るフィールドサイエンスの視点から	
代表者：益田岳 (東京女子医科大学医学部 助教)	187

第3部 海外拠点連携共同研究

1. デングウイルス認識抗体の網羅的解析系の構築	
代表者：宮内 浩典（国立感染症研究所 主任研究官）	191
2. ケニアにおけるワクチン効果と分布ロタウイルス株の性状との関連の解明	
代表者：河本 聡志（藤田医科大学医学部 准教授）	197
3. ケニアにおけるマダニ媒介感染症の疫学調査	
代表者：早坂 大輔（山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 教授）	202
4. ベトナムにおける下痢原性大腸菌のワンヘルスアプローチ	
代表者：井口 純（宮崎大学農学部畜産草地科学科 准教授）	209
5. ケニアにおける真菌症原因菌およびカビ毒産生菌の収集と形態学的、生理学的、分子生物学的解析	
代表者：矢口 貴志（千葉大学真菌医学研究センター 准教授）	214
6. 住血吸虫ライフサイクルにおける中間宿主に対する環境因子の影響	
代表者：王寺 幸輝（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 准教授）	223
7. ケニアにおけるイエカ属蚊の種構成およびウイルス相に関する研究	
代表者：前川 芳秀（国立感染症研究所昆虫医科学部 主任研究官）	229
(附) 熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿	239

第 1 部

一 般 共 同 研 究

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：赤痢アメーバ由来レクチン Ig1 の結晶構造解析
課 題 番 号：2022-Ippan-01
2. 代 表 者：長崎大学大学院 工学研究科・准教授 海野 英昭
共 同 研 究 者：長崎大学 熱帯医学研究所 生態疫学分野・助教 加藤 健太郎
長崎大学大学院 工学研究科・教授 畠山 智充
長崎大学大学院 工学研究科・M2 野中 陽菜
長崎大学 工学部 化学物質工学コース・B4 西谷 祥

3. 決 定 額：450 千円

4. 研究計画

① 研究目的

赤痢アメーバは腸粘膜に潰瘍をつくる事で大腸炎を発症させるが、その傷害発生機構の詳細は不明であった。長崎大学熱帯医学研究所の加藤らによって、世界で初めて赤痢アメーバのもつレクチン Ig1 に溶血活性および細胞傷害活性を確認され、Ig1 が関わる病原性発現機構が明らかになりつつある(K. Kato, *et al*, *Scientific Reports*, **5**, 13901, (2015))。

この Ig1 の持つレクチン活性および細胞傷害活性機構を、X 線結晶構造解析により明らかにする本研究は、アメーバ赤痢の病原性を解明する鍵となる中心課題であると言える。Ig1 は他の機能既知タンパク質とは相同性を示さない事から、その立体構造および作用メカニズムは非常にユニークなものである事が予想され、この研究成果はこれまでに類似研究の報告がない世界的に卓越したものになると考えている。

② 研究内容

本研究対象である赤痢アメーバ由来 Ig1 の機能については、これまでに長崎大学熱帯医学研究所の加藤らによりその詳細な研究が行われ、Ig1 の有するユニークなレクチン活性および細胞障害活性等が明らかにされてきた(K. Kato, *et al*, *Scientific Reports*, **5**, 13901, (2015))。本研究は、Ig1 に関する遺伝子資源および豊富な技術的知見を有する熱研の加藤氏との綿密な共同研究体制の元に、畠山が Ig1 の細胞障害活性を引き起こすと推定している Ig1 のペプチダーゼ活性の機能解析、海野が Ig1 の結晶構造解析を行う共同研究プロジェクトである。この機能解析および構造解析の実験計画の詳細について以下に示す。

- 1) Ig1 の各種発現系の構築、大腸菌を用いた発現、および精製 予測計算の結果、構造に揺らぎを生じにくいと推定された各 Ig1 領域(Ig114-543, Ig1544-657, Ig1658-812, Ig1813-1088)について、それぞれ大腸菌を用いた発現および精製を行う(発現ベクターは既に構築済み)。精製において目的タンパク質は、大腸菌の破碎後に可溶化、リフォールディング、His-tag 精製、および TEV プロテアーゼによるタグ切断を行い、結晶化を行うために十分な量および純度のサンプルを得る。
- 2) Ig1 の結晶化
上記のより得られた各種精製 Ig1 を用いて、結晶化のスクリーニングおよびその条件の最適化を行う。必要に応じて糖との複合体形成を検討し、十分なクオリティのタンパク質結晶を得る。結晶のクオリティチェックには長崎大学共有機器の X 線回折装置、および放射光測定を利用し、その分解能向上を指標に結晶化条件の最適化を行う。
- 3) Ig1 の結晶構造解析
得られた結晶を用いて放射光を用いた X 線回折データを収集し、位相決定を経てその結晶構造を決定する。その後、糖との複合体構造の詳細を解析する事で、Ig1 糖特異性の構造 的基盤を明らかにする。
- 4) Ig1 の機能・構造解析による細胞障害機構の解明
Ig1 は、これまでの畠山による機能解析研究によりプロテアーゼ活性および自己断片化活性が確認されつつあり、この活性が細胞障害に深く関わっている事が示唆されている。このプロテアーゼ活性の基質特異性を解析し、それによりその Ig1 の細胞障害機能との関係を明らかにする。これによるプロテアーゼ活性の詳細な知見は、3)で得られる結晶構造解析の知見と統合する事で、赤痢アメーバが Ig1 を利用して人体に感染するメカニズムを構造の立場から明らかにする。

③ 予想される成果

本研究により Ig1 の詳細な機能および立体構造が明らかになる事で、赤痢アメーバが Ig1 を利用して人体に感染するメカニズムを構造の立場から明らかにできると考えている。これらの知見は、そのメカニズムの解明のみならず、Ig1 の詳細な機能と構造情報を用いて阻害剤を設計する事で、赤痢アメーバ症特異的治療薬の設計および開発が可能となる。この治療薬開発は、現在発展途上国に蔓延している赤痢アメーバ症の根絶を目指すために達成 すべき課題である。加えて、近年は先進国においても、性感染症としてアメーバ赤痢の感染 者数が年々増加している。以上の事から本研究は、熱帯医学および国際保健の両面において、赤痢アメーバ感染症の問題を解決に導く研究プロジェクトと位置付ける事ができる。

本研究に参画する大学院生は、タンパク質の機能・構造解析研究に関わる、高度なタンパク質精製/解析技術、および遺伝子工学技術を習得し、またその研究成果を国際誌・国際学会等で発表する事で、高い教育効果が期待できる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

これまでの研究により、Igl 全長（F-Igl）および Igl の C 末側領域（C-Igl (603-1088)）の結晶化では目的の結晶が得られていなかったことから、その構造中における部分的な構造的揺らぎ領域の存在の可能性が考えられた。そこで、Igl の有する溶血活性を保持しつつ部分領域をさらに小さくした、各種 Igl の発現系を構築し、その発現精製および結晶化の検討を行なう事とした（図 1）。Igl の部分領域である Igl-a (822-1083)、Igl-b (914-1083)、Igl-c (1003-1083) および Igl-d (17-556) の大腸菌を用いた発現系の構築、発現・精製条件の検討、および結晶化の検討をおこなった。それらの発現および精製条件の検討により、これら Igl-a ~ Igl-d の精製に成功した。得られた精製タンパク質を用い、結晶化条件探索を行った。

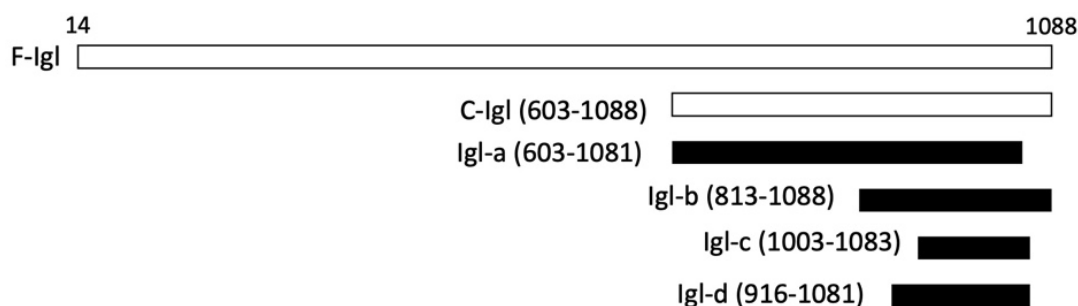


図 1. 発現系を構築した Igl の部分領域である Igl-a ~ Igl-d

② 成果（結果+考察）

Igl の部分領域である Igl-a、Igl-b、Igl-c および Igl-d について、N 末端に His タグを融合した組替え型発現ベクターを構築した。得られたベクターを用いて大腸菌の形質転換をおこなった。各種組換え型 Igl の大腸菌を用いた発現、および精製条件の検討を行なった。発現・精製条件の検討では、37℃での発現誘導および破砕液の不溶性画分からの可溶化・リフォールディングの検討、および 20℃での発現誘導および破砕液上清の可溶性画分からの精製の検討を行なった。精製には、His タグを利用した Ni アフィニティークロマトグラフィー、TEV protease によるタグの切断とその分離、およびゲル濾過クロマトグラフィーを用い、精製純度は SDS-PAGE により確認した。

Igl-b (914-1083) および Igl-c (1003-1083)の精製～結晶化

Igl-b および Igl-c の発現・精製条件検討結果、両者はいずれも不溶性画分からの可溶化・リフォールディングの手法により、良好な収量で目的タンパク質が得られる事を確認した。その後、Ni アフィニティークロマトグラフィー（図 1）およびゲル濾過クロマトグラフィー（図 2）により、良好な状態および収量を得た事を確認した。

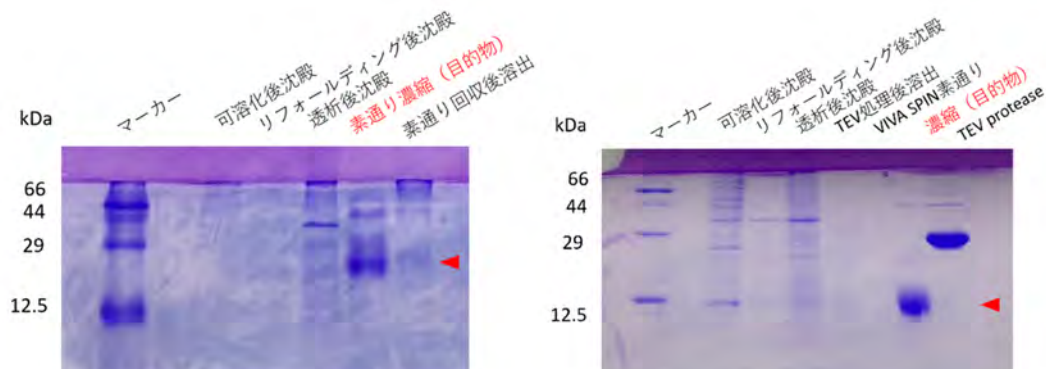


図 2. Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製された Igl-b（左）および Igl-c の SDS-PAGE. 赤矢印部分が目的タンパク質.

得られた精製 Igl-b, および Igl-c の収量はそれぞれ 2 mg および 5 mg であった。これらについて 20°C にて結晶化スクリーニングを各約 200 条件行なったが、目的のタンパク質結晶は得られなかった。タンパク質精製の過程において Igl-b および Igl-c は比較的安定であり、また精製純度も十分な調製を行ったにもかかわらず結晶が得られなかった理由は、Igl-b および Igl-c 内に構造的揺らぎを含む部分が存在し、それが結晶化を妨げている可能性が考えられた。

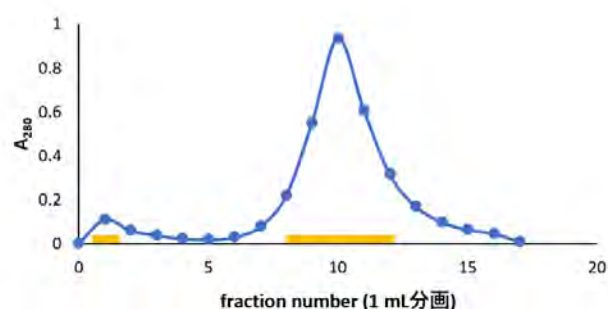


図 3. Igl-c のゲル濾過クロマトグラフィー

Igl-a (822-1083) および Igl-d (17-556), の精製～結晶化

Igl-a および Igl-d についても、上記の Igl-b および Igl-c と同様の手法で目的タンパク質の発現・精製条件を検討した結果、不溶性画分からの可溶化・リフォールディングの手法により目的タンパク質が得られた事を確認した。その後、Ni アフィニティークロマトグラフィー（図 4）およびゲル濾過クロマトグラフィー（図 5）を行い、精製量 2 mg の Igl-d が得られた。それをを用いて約 200 条件の結晶化条件探索を行なったが、目的のタンパク質結晶は得られなかった。

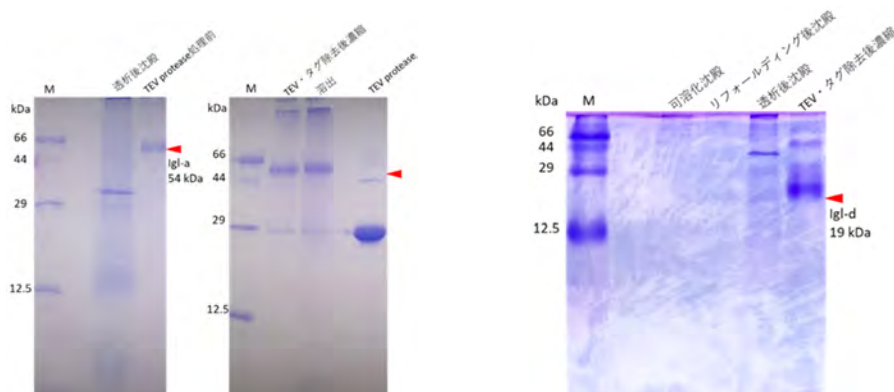


図4. Niアフィニティークロマトグラフィーにより精製された Igl-a (左) および Igl-d の SDS-PAGE. 赤矢印部分が目的タンパク質.

結晶が得られなかった理由は、Igl-b および Igl-c と同様に、内部に構造的揺らぎを含む領域が存在し、それが結晶化を妨げている可能性が考えられた。

以上の結果から、本研究で構築した Igl の部分領域 (Igl-a~d) はいずれも非常にフレキシブルな構造状態を有することが示唆された。この高い安定性と非常にフレキシブルな特徴を併せ持つ Igl のユニークな特性は、そのユニークな機能 (弱い溶血活性、低い特異性の糖結合活性、および弱いプロテアーゼ活性を併せ持つ) と密接に関係している事が推測され、Igl 機能の構造的基盤を明らかにする上で、非常に興味深い知見が得られたと考えている。

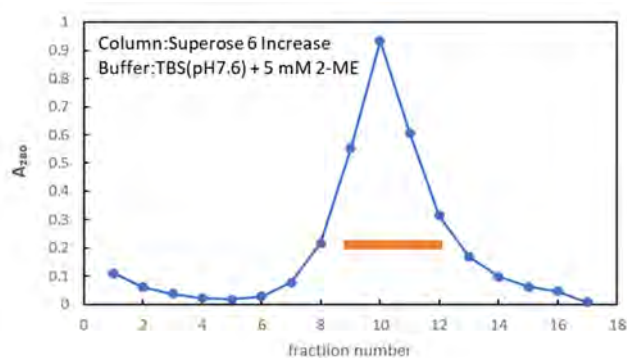


図5. Igl-d のゲル濾過クロマトグラフィー

③ 成果の公表

- 本研究成果は大学院生による学会発表を行った。
2022年9月23日 農芸化学会2022年度西日本支部大会
口頭発表：D-p03 赤痢アメーバ由来 Igl の結晶化 / 発表者：野中陽菜
- 卒業論文および修士論文として研究成果を報告した。
長崎大学大学院工学研究科 修士論文：赤痢アメーバ由来レクチン Igl の結晶化 / 野中陽菜 (2023年2月)
長崎大学工学部化学物質工学コース 卒業論文：赤痢アメーバ由来レクチン Igl の結晶化に関する研究 / 西谷祥 (2023年3月)

6. 自己評価

本年度の研究では、Igl の部分領域である Igl-a、Igl-b、Igl-c および Igl-d の発現、精製、結晶化の各条件検討をおこなった。それらの条件検討の結果、Igl-b、Igl-c、Igl-d の発現・精製条件を確立し、それらの結晶化を行なった。各種結晶化条件検索の結果、タンパク質結晶は得られなかった一方、その結晶化溶液にタンパク質沈澱はほとんど生じなかった。このことは、これらの Igl 部分領域は非常に安定であり、かつ通常のタンパク質とは大きく異なるフレキシブルな構造状態を有することを示唆している。この高い安定性と非常にフレキシブルな特徴を併せ持つ Igl のユニークな特性は、そのユニークな機能（弱い溶血活性、低い特異性の糖結合活性、および弱いプロテアーゼ活性を併せ持つ）と密接に関係している事が推測され、Igl 機能の構造的基盤を明らかにする上で、非常に興味深い知見が得られたと考えている。このフレキシブル構造故に結晶化は難しいと考えられるため、今後はクライオ電顕等の他の分析手法等を用いて、この構造と機能の関係を明らかにしたいと考えている。

以上の事から、本年度の研究成果としては、本実験の過程で Igl のユニークな特性を見出し、今後の Igl 研究を進める上で有益な知見が得られた。不満は残るが、一応の成果を挙げる事が出来たと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙がらなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：トランスポゾンシーケンシングにより選択したビブリオ バルニフィカスの生体内増殖必須遺伝子の機能解析

課 題 番 号：2022-Ippan-02

2. 代 表 者：柏本 孝茂(北里大学 獣医公衆衛生・准教授)

共 同 研 究 者：児玉 年央(長崎大学 細菌学分野・教授)

山崎 浩平(北里大学 獣医公衆衛生・講師)

3. 決 定 額：350 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究の目的は、**V.v.の生体内増殖必須遺伝子の機能解析である。**具体的には、昨年度、Tn-seq 法により同定した V.v.の持つ生体内増殖に必須の遺伝子を、1) 生体内リザーバーとなる創傷感染局所で機能する遺伝子と 2) 死亡要因となる全身循環中で機能する遺伝子に分け、更にそれらを、3) マウスの致死を指標にして遺伝子の重要度を決定した後、4) その機能解明に取り組む。機能解明へのアプローチ法は選抜された個々の遺伝子によるが、おおまかには、タンパク質ドメイン検索や立体構造予測に基づいた構造機能相関予測から *in vitro* 実験を計画する。5) 明らかとなった機能を破壊した変異体タンパク質を野生型タンパク質とスワップした V.v.変異株を作製し、マウスに接種して生体内における機能とマウスの致死に与える影響を解析する。これらの研究結果から、最終的に抗生物質と併用可能な本菌の新規生体内増殖制御法の開発へと繋げる。

② 研究内容

<貴研究所との関係性> 児玉グループは、*Vibrio* に対する遺伝子操作技術とそれを利用した病原性解析のノウハウを蓄積されている。本計画内で Tn-seq 法により選抜された V.v.の生体内増殖必須遺伝子の機能解析を行う際、解析の一部を担当して頂くと共に、技術指導やアドバイスを頂く。我々は、**これまでにも、児玉グループとの共同研究を実施しており、それらの結果は、過去3年間に限っても2本の論文として結実している。**

<研究計画>選抜した変異株を *V. vulnificus* の創傷感染の病態を再現し得る創傷感染モデルマウスに接種し、①感染局所および②全身循環中における増殖能を評価する。これにより、生体内リザーバーとなる感染局所において増殖に関与する遺伝子と敗血症発症後に全身循環中において増殖に関与する遺伝子およびその両方で増殖に関与する遺伝子に分けることができる。加えて、それら変異株のマウスに対する致死性を指標に重要な遺伝子を選抜し、優先順位の高い順に機能解析に取り組む。

③ 予想される成果

昨年度、本共同研究助成を受け、*V.v.*のマウス創傷感染モデルを利用した Transposon sequencing (Tn-seq) 法を実施し、*V.v.*が生体内において増殖に必須とする遺伝子を網羅的に同定すると共に、それらを重要度が高いと思われる順に選抜することに成功した。**今年度は、それら遺伝子の機能解析を試みる計画となっている。**本研究計画は、*V.v.*が生体内増殖に必要とする遺伝子を感染菌の生体内リザーバーとなる感染局所の皮下や筋肉などで必要とされるものと、死亡要因とされている敗血症に繋がる循環血中での増殖に必要とされるものに分け、それらの宿主の致死に対する寄与度を明らかにする計画である。本研究から得られる成果は、抗生物質治療にもかかわらず、依然、致死率の高い本感染症の**感染段階別新規増殖制御法の開発に繋がる。**

5. 実施報告

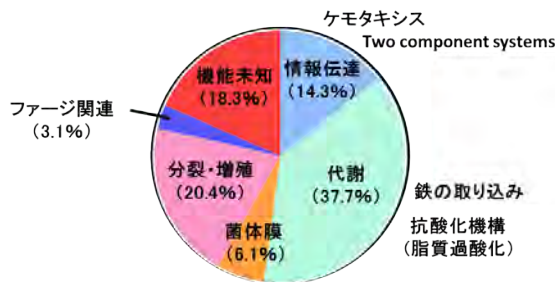
① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

申請計画通り、Tn-Seq 法により同定した *V.v.*の持つ生体内増殖に必須の遺伝子を、1) 生体内リザーバーとなる創傷感染局所で機能する遺伝子と 2) 死亡要因となる全身循環中で機能する遺伝子に分けることができた。これら遺伝子の中から重要度の高いものを選抜し、その機構解析に取り組むのと並行して、3) 感染における遺伝子機能の最終評価を行う際、利点となるよう、創傷感染モデルマウスのより詳細な解析を行った。

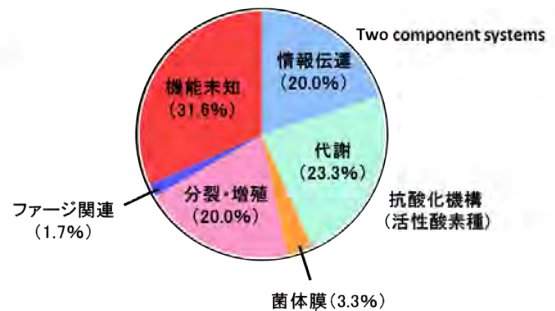
② 成果（結果＋考察）

*V.v.*の持つ遺伝子数 4,433 の約 2.7 倍にあたる 12,000 株からなるトランスポゾン変異株ライブラリーをマウスの大腿部皮下に接種し、感染局所の筋肉内、および、全身循環への侵入や増殖に必須の遺伝子をそれぞれ選抜、分類した。その結果、① 感染局所と全身循の両方において、*V.v.*の侵入、増殖に必須の遺伝子として、60 遺伝子を選抜・分類できた。また、感染局所の筋肉内への侵入、増殖には影響しないが、全身循環中への侵入や増殖に必須の遺伝子として 100 遺伝子を選抜・分類できた。①で選抜された 60 遺伝子を推定される機能により分類した結果、菌の代謝に関する遺伝子が 37.7%、分裂・増殖が 20.4%、機能未知 18.3%、情報伝達が 14.3% および菌体膜成分が 6.1% を占めていた（下図）。同様に②では、機能未知が 31.6%、菌の代謝が 23.3%、分裂・増殖が 20.0%、情報伝達が 20.0% および菌体膜成分が 3.3% を占めていた（下図）。①では、化学走化性受容体、シグナル伝達系および既知の好中球抵抗因子が多く検出されたことから、*V.v.*は、外部環境の変化を感知し、好中球から逃避していることが明らかとなった。有効な根治療法のない *V.v.* 感染において、感染初期における体内での菌の増殖・拡散を防ぐためには、感染の初期段階で増殖のリザーバーとなる局所筋肉内への侵入を防ぐことも有効であると考えられた。そこで、①で選抜された遺伝子の中から好中球抵抗性に関与すると考えられる遺伝子と筋肉内に侵入するために必要と考えられる遺伝子を幾つか絞り込み、個別の機能解析を行うこととした。

感染局所でも全身循環でも必要



全身循環でのみ必要



③ 成果の公表

機能解明が終了していないため、成果は公表していない。

6. 自己評価

本年度研究計画により、*V. v.*の生体内にける挙動や生存戦略の外貌を明らかにすることができた。今後、最終目標である、根治療法のない *V. v.*の新規治療法を開発する上で、*V. v.*が生体内で生存するために必要としている遺伝子機能の詳細を明らかにし、治療へ応用可能な感染段階を把握することが肝要と考える。そのため、引き続き、重要と思われる遺伝子機能の解析と、感染モデルを用いた機能の検証を実施して行く。十分に成果を上げることが出来たと考える。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期の成果はほとんど挙がらなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

当初の計画通り、*V. vulnificus*が生体内での増殖に必須とする遺伝子を感染局所で必須となるもの、および全身循環で必要となるものに分け、それらを機能分類することで *V. v.*の生体内生存戦略の外貌を明らかにすることが出来た。今年度研究計画により得られた成果により、新規治療法の開発へと近づくために必要な次段階の研究計画である、増殖必須遺伝子の機能解析へと進めることが出来た。

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：赤痢アメーバレクチンの糖鎖認識特異性の解明

課 題 番 号：2022-Ippan-03

2. 代 表 者：国立大学法人鹿児島大学・助教 新地 浩之

共 同 研 究 者：国立大学法人鹿児島大学・特任教授 隅田 泰生

国立大学法人長崎大学・助教 加藤 健太郎

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

赤痢アメーバ症は、原因寄生虫である赤痢アメーバの感染に起因する熱帯・亜熱帯病の一つである。全世界で約 5,000 万人が赤痢アメーバに感染しており、年間 4-10 万人が赤痢アメーバ症により死亡する。赤痢アメーバは、その嚢子が飲料水や食物を介してヒトの体内に入り、小腸で脱嚢して栄養体となり、大腸にて感染する。この大腸での感染において、赤痢アメーバ表面の Gal/GalNAc 結合レクチン（Heavy (Hgl)、Light (Lgl) および Intermediate (Igl) レクチン）が関与することが示唆されている。しかし、熱研・加藤助教らの報告によると、これらのレクチンと糖鎖の親和性は極めて低く[Kato K., et al., *Sci. Rep.*, **5**, 13901 (2015)]、詳細な結合様式が明らかにされていない。本研究は、糖鎖固定化金ナノ粒子（SGNP）を用いて赤痢アメーバレクチンの糖鎖認識特異性を解析し、赤痢アメーバの感染メカニズムを明らかにすることを目的とする。

② 研究内容

本申請課題では、赤痢アメーバレクチンのうち、Hgl と Igl が結合する糖鎖構造およびその詳細な結合様式を明らかにすることを目標とする。代表者の新地および隅田が、赤痢アメーバレクチン結合候補糖鎖を固定化した SGNP を調製して、熱研・加藤助教に供する。熱研・加藤助教は、組換え型赤痢アメーバレクチンを用いて、SGNP との結合性を解析し、その結合する糖鎖構造と結合様式の詳細を明らかにする。組換え型タンパク質で SGNP に対する結合性が見られない場合は、赤痢アメーバの細胞膜画分を用いて、赤痢アメーバ細胞表面に存在するレクチンの糖鎖認識特異性を明らかにする。

③ 予想される成果

SGNP を用いるアッセイは、従来の赤血球凝集反応では解析できない、溶血活性を有する Igl のようなレクチンの認識糖鎖を明らかにできる。また、SGNP 表面の糖鎖は構造が明確であり、レクチンが認識する糖鎖の結合様式を詳細に解析できる。Hgl

や Igl の認識糖鎖は、Gal/GalNAc であることが示唆されているが、 α 体または β 体のどちらを認識できるかは明らかにされていないため、SGNP を用いれば、これらのレクチンが認識する糖鎖の結合様式を明らかにできる。また、Hgl や Igl が Gal 以外の糖鎖を認識するかどうかを明らかにすることができる。赤痢アメーバ細胞膜画分と SGNP を用いた研究からは、既報のレクチンとは異なる糖鎖認識特異性を有する新規レクチンを同定できる可能性がある。

本研究で赤痢アメーバレクチンが認識する糖鎖の認識特異性が解明されれば、赤痢アメーバの感染メカニズムの解明に繋がり、最終的には赤痢アメーバ症の予防薬等の開発に繋がることが期待される。

5. 実施報告

① 令和 4 (2022) 年度実施計画に対する実施状況

2022 年度は、既報[Nakamura-Tsuruta S., et al., *J. Biochem.* 143, 833-839 (2008)]を参考に、代表者の新地らが異なる糖成分を固定化した 6 種類の SGNP (β Gal-GNP、 β GalNAc-GNP、 α Gal-GNP、 α Glc-GNP、 α GlcNAc-GNP、 α Man-GNP) を調製した。また、コントロールとして、非糖鎖成分であるテトラエチレングリコール (TEG) を固定化した GNP (TEG-GNP) も調製した。熱研・加藤助教は、既報[Kato K., et al., *Sci. Rep.*, 5, 13901 (2015)]に従って、赤痢アメーバ表面の Gal/GalNAc 結合レクチン (Igl) を遺伝子組み換えによって調製した。この組換え型 Igl と SGNP との結合性を、凝集反応を観察して評価した。

② 成果 (結果+考察)

糖鎖とタンパク質の結合親和性は、通常、タンパク質同士の結合親和性に比べて極めて低い。そのため、糖鎖-タンパク質間の相互作用を解析するためには、糖鎖を密集 (クラスター化) させて、見かけの親和性を向上させる必要がある。SGNP は、その表面に糖鎖が高密度に固定化されているため、糖鎖クラスター効果によって結合親和性の低いレクチンとの相互作用を解析できると考え、本研究に使用した。

レクチンのコントロールには、 β Gal 結合性のピーナッツレクチン (PNA) を用いた。各 SGNP を組換え型 Igl または PNA と混合後、一晚静置した。その後、遠心分離し、凝集反応を観察後、上澄みの吸光度 (530 nm) を測定した。コントロールの PNA と β Gal-GNP を混合したところ、凝集反応が観察された。また、PNA の濃度が高いほど凝集性が高く、上澄みの吸光度が低下した (図 1A)。この凝集反応は、 β Gal-GNP との特異的な凝集反応であり、他の SGNP では観察されなかった (図 1B-F)。一方、組換え型 Igl は、 β Gal-GNP や β GalNAc-GNP と混合しても、凝集反応を示さなかった (図 1A,C)。同様に、他の 4 種類の SGNP でも組換え型 Igl との凝集反応は観察されなかった (図 1B,D-F)。赤痢アメーバレクチンは、Gal または GalNAc に結合することが示唆されているが、いずれの SGNP とも凝集反応を示さなかった原因を以下のように考察した。SGNP とレクチンが凝集反応を示す場合、多価の糖鎖結合部位を有するレクチンが、SGNP と架橋して凝集体を形成する必要がある。PNA は同一のサブユニット 4 個からなるレクチンであり、 β Gal-GNP と架橋したため凝集したが、組換

え型 Ig1 は水溶液中で単量体として存在しており、 β Gal-GNP や β GalNAc-GNP に結合しても架橋できずに凝集反応を示さなかったと考えた。したがって、表面プラズモン共鳴法などの他の手法で、相互作用を解析することを検討している。

組換え型 Ig1 は SGNP との凝集反応を示さなかったが、非糖鎖成分である TEG を固定化した GNP と混合したところ、組換え型 Ig1 の濃度に依存して、遠心分離後の上澄みの吸光度が上昇した (図 1G)。TEG-GNP は、SGNP と比べて分散性が低く、水溶液中で二次粒子を形成しやすい。この吸光度の上昇は、TEG-GNP の分散性が改善したことによるものと考えられ、予想外ではあったが、組換え型 Ig1 に TEG-GNP の分散性を改善する作用があることが分かった。以上のことから、組換え型 Ig1 には界面活性作用があり、赤痢アマーレクチンが示す溶血・細胞傷害活性は、Ig1 の界面活性作用によって誘導されることが示唆された。

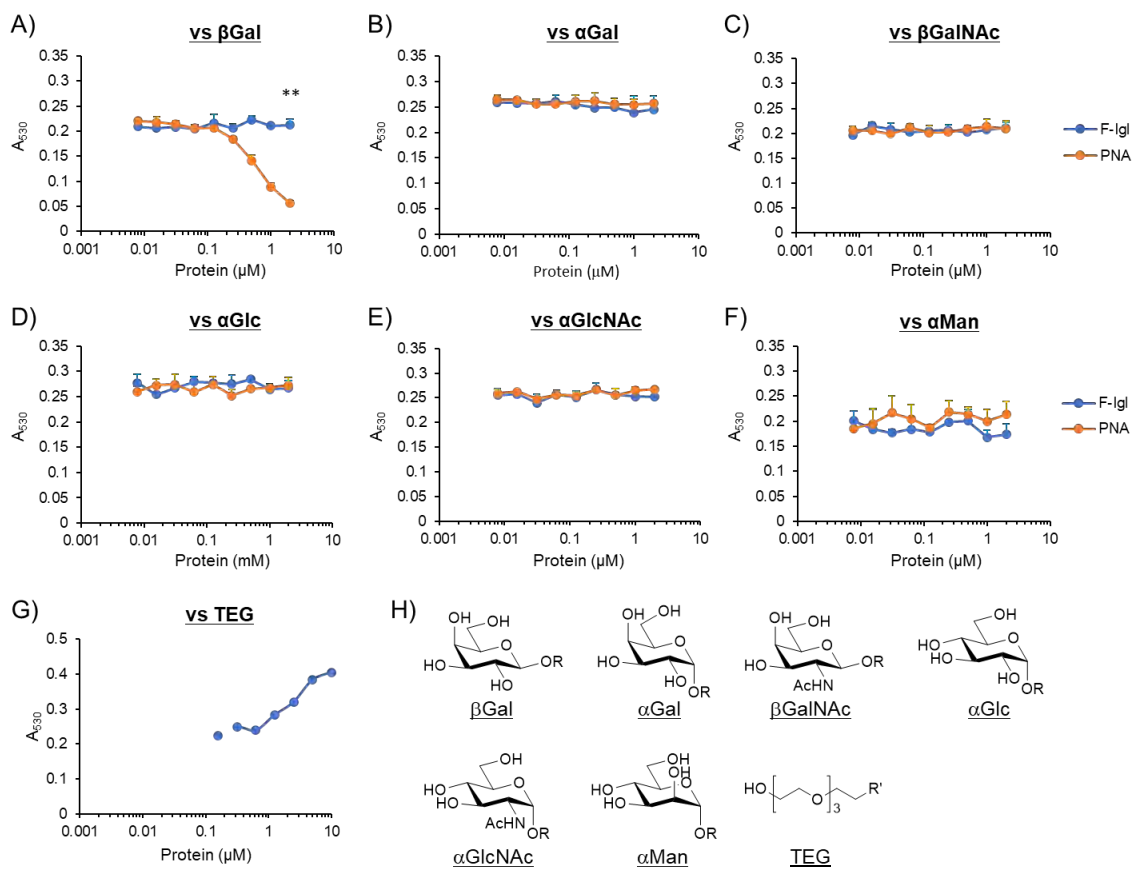


図 1. 組換え型 Ig1 と SGNP の相互作用解析 (A) β Gal-GNPs、B) α Gal-GNPs、C) β GalNAc-GNPs、D) α Glc-GNPs、E) α GlcNAc-GNPs、F) α Man-GNPs、または G) TEG-GNPs を組換え型 Ig1 と混合後、一晩静置し、遠心分離後に測定した上澄みの 530 nm の吸光度、H) GNP 表面に固定化した単糖成分および TEG の構造)

③ 成果の公表
該当なし

6. 自己評価

本研究では、SGNPを用いて組換え型 Igl が結合する糖鎖構造を解析する計画であったが、SGNP と組換え型 Igl との凝集反応を観察できなかった。先述した通り、これは、組換え型 Igl が水溶液中で単量体として存在しているためと考えられる。したがって、単量体のタンパク質でも結合性を解析できる表面プラズモン共鳴法や ELISA などの手法を用いれば、組換え型 Igl との相互作用を解析できると考えている。一方、TEG-GNP との相互作用を解析したところ、組換え型 Igl に界面活性作用があることが示唆された。さらなる詳細な解析が必要なため、表面張力等を測定して Igl に界面活性作用があることを示す予定である。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：サルモネラ全身感染メカニズムの解明と薬剤耐性菌治療への応用
課 題 番 号：2022-Ippan-04

2. 代 表 者：（北里大学薬学部・講師）羽田健
共 同 研 究 者：（長崎大学熱帯医学研究所細菌学分野・准教授）日吉大貴
（北里大学薬学部・学部生）小林莉花
（北里大学薬学部・学部生）菅野菜穂
（北里大学薬学部・学部生）宮崎友梨香

3. 決 定 額：350千円

4. 研究計画

① 研究目的

サルモネラは食中毒の原因菌であり、本菌に感染した場合、健康な成人のほとんどは下痢、嘔吐、腹痛など局所的な症状にとどまるが、小児や高齢者では菌血症や敗血症などの全身感染を引き起こし、死に至ることがある。現在、サルモネラによる菌血症や敗血症にはフルオロキノロンや第三世代セフェム系抗菌薬が用いられている。しかし、2000年代初頭からフルオロキノロン耐性サルモネラが分離され始め、毎年増加している（Shane AL, et al. 2017）。また、拡張型 β -ラクタマーゼ産生サルモネラの出現が問題となっている（Threlfall EJ, et al. 2002）。このような多剤耐性化によって、治療が困難となるサルモネラ感染症は年々増加傾向を示している。また、超高齢社会に突入し高齢者の増加が続く我が国においても、このようなサルモネラ感染症による死亡者数の増加が懸念される。一方で、サハラ砂漠以南のアフリカの発展途上国では、成人において22-47%の死亡率を示す侵襲性のサルモネラが懸念されている（Morpeth SC, et al. 2009）。以上の背景からも、サルモネラ感染症はWHOによって「速やかな研究開発が望まれる感染症」の1つに挙げられており（Tacconelli E, et al. 2017）、世界的にサルモネラ感染症に対する新たな感染予防・治療法の開発が求められている。

申請者らは最近、全身感染とマクロファージの細胞死誘導性との関連を見出し、マクロファージの細胞死誘導に関わる5つのT3SS-2エフェクターを同定した（Matsuda S, Haneda T, et al. 2019）。しかしながら、それらエフェクターによるマクロファージの細胞死誘導の分子メカニズムは明らかになっていない。本研究課題では、T3SS-2によるマクロファージ細胞死誘導機構を解明することによりサルモネラの全身感染発症機構を紐解く。さらにそこから、T3SS-2によるサルモネラの新たな生存戦略を明らかにし、サルモネラの病原性発現機構の詳細な理解を実現することを目的とする。

② 研究内容

これまでの研究代表者らの実験から、サルモネラによるT3SS-2依存的細胞死は感染16

時間から 24 時間で誘導されることが明らかになっている。実際にそのタイムフレーム内、もしくはそれ以前に、これまでに特定したエフェクターXを含む5つのエフェクターが分泌され、マクロファージの細胞死を誘導するのか、サルモネラをRAW細胞に感染し、タイムラプス顕微鏡解析により明らかにしたいと考えている。しかし、サルモネラはBSL-2レベルの病原体であることから、解析できる顕微鏡が限られている。そこで、サルモネラ研究分野に精通した細菌学分野の日吉大貴助教の協力のもと、解析が実現できる熱研共同研究利用機器の共焦点レーザー顕微鏡（Confocal AR1、ニコン）を活用したいと考える。解析には、研究代表者が構築した各種RAW遺伝子欠損細胞や、サルモネラのエフェクター欠損株を用い、マクロファージの細胞死とエフェクターの関係を経時的に明らかにする。また、適宜蛍光タンパク質を使用して、菌体またはエフェクターを標識することで細胞内での局在を示す。

③ 予想される成果

T3SS-2 エフェクターはこれまでに約 30 種類同定されており、それらが相互作用することでサルモネラは病原性を発揮する (Jennings E, et al. 2017)。エフェクター研究の多くは宿主因子との1対1の相互作用を対象としており、複数のエフェクターが協調的に作用する感染全体を把握することが困難であった。研究代表者らは、最近、エフェクターの中には機能が重複するものがあることを明らかにした (Takemura M, Haneda T, et al. 2021)。本研究課題の特色は、細胞死誘導に関わる5つのエフェクターに注目し、それぞれのエフェクターがどのように細胞死の誘導に関わるのかを明らかにすることである。これによりエフェクターの機能解析が単純になり、これまで明らかにできなかった T3SS-2 エフェクターによるマクロファージ細胞死の誘導メカニズムを明らかにすることが可能となる。また、本研究はサルモネラ血清型の1つであるネズミチフス菌の自然宿主であるマウスをヒトのサルモネラ感染のモデルとした研究であることから、その成果はヒトに対するより有効なワクチンの開発のための有用な基盤となることが期待できる。さらに、細胞死を起こさない株は、T3SS-2 欠損株と同様に極端に病原性が低下することから、T3SS-2 による細胞死は、サルモネラが宿主内で増殖する上で重要であることを示す。従って、エフェクターの発現や分泌、または細胞死を阻害する薬剤は、既存薬と異なる新たなサルモネラ感染症治療薬のターゲットとなり、薬剤耐性の問題を克服できる可能性も期待できる。

一方、サルモネラ属に分類されるチフス菌の全身感染症である腸チフスは世界で一年間に 3000 万人が罹患していると推測される (Stanaway JD, et al. 2019)。南アジア、東南アジアでの罹患率が高く、近年ではこのような流行地域で分離されるチフス菌の多くは多剤耐性チフス菌である。このようなチフス菌に感染した場合、治療に有効な抗生物質がないため、腸チフス患者の致死率は現在の1%から10%にまで上昇すると予想されている (Tanmoy AM, et al. 2018)。本研究により明らかにされる細胞死誘導機構はチフス菌の病原性解明の重要な情報となり、エフェクターや細胞死を標的とした新たな薬剤は発展途上国で蔓延する腸チフスの新たな治療薬としても見込める。

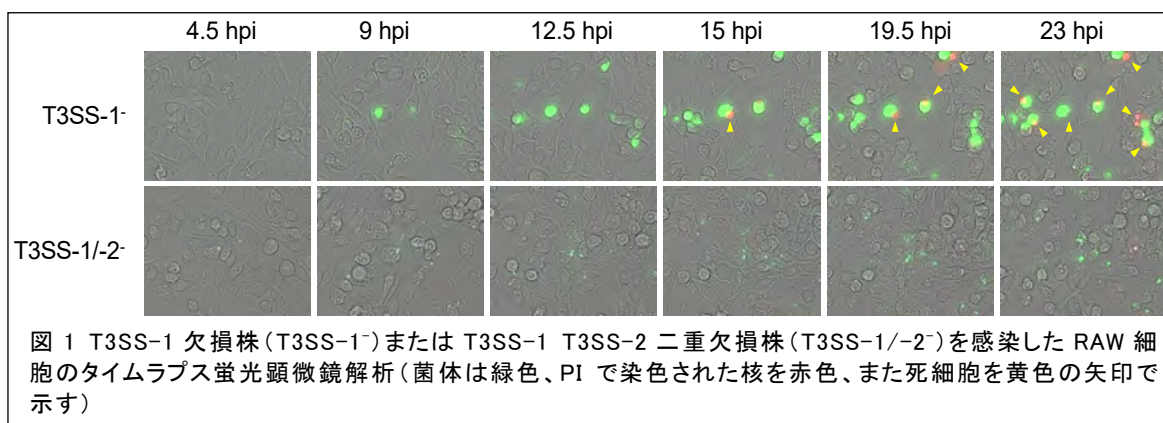
5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

マウスマクロファージ様培養 RAW264.7 (RAW) 細胞を 96-well plate に 1×10^5 /well と なるように播種し、翌日、GFP 発現プラスミドを保有するネズミチフス菌 ATCC14028 由来ナリジクス酸耐性株 (SH100) の T3SS-1 欠損 (T3SS-1⁻) 株または T3SS-1 および T3SS-2 二重欠損 (T3SS-1/-2⁻) 株を RAW 細胞 1 細胞あたり 10 cfu (multiple of infection: moi = 10) となるように感染し、感染 4 時間後から 24 時間後までキーエンス BZ-X710 によりタイムラプス蛍光顕微鏡観察を行った。死細胞の観察には膜非透過性の核染色剤である Propidium Iodide を使用した。

② 成果（結果+考察）

研究代表者はこれまでに T3SS-2 により RAW 細胞に Caspase-11 依存的細胞死（非典型パイロトーシス）が誘導されることを明らかにしている（データ未発表）。本研究では各種ネズミチフス菌を RAW 細胞に感染し、タイムラプス蛍光顕微鏡観察を行うことにより T3SS-2 による RAW 細胞内での増殖亢進を確認し、さらに T3SS-2 依存的な細胞死は感染 15 時間以降に誘導されることを明らかにできた（図 1）。また、形態学的特徴から多くの細胞でパイロトーシス様の細胞死が誘導されていることを確認できた。一方で、パイロトーシスとは異なる細胞死が誘導されている細胞も認められた。このことから、ネズミチフス菌感染によって T3SS-2 によりマクロファージにパイロトーシス以外の細胞死が誘導され、またサルモネラはマクロファージにこれら複数の異なる細胞死を誘導することで宿主に全身感染を惹起することが示唆された。



③ 成果の公表

【学会発表】

羽田健 サルモネラ T3SS-2 によるマクロファージ細胞死誘導機構

第 96 回日本細菌学会総会、2023 年 3 月 17 日

6. 自己評価

本研究の目的はサルモネラのマクロファージ細胞死誘導機構を解析することで、サルモネラの全身感染における新たな感染メカニズムを明らかにすることである。

タイムラプス蛍光顕微鏡解析は、感染現象を時間経過に沿って視覚的に捉えることができるため、説得力のあるデータを得ることができる。本研究課題では実験系を構築するところから開始した。実際には GFP を発現するネズミチフス菌を RAW 細胞に感染し Propidium Iodide により死細胞の核染色を行うことで、T3SS-2 依存的なマクロファージのパイロトーシスが誘導されることを観察することができた。今後はこれまでに研究代表者が構築した遺伝子欠損 RAW 細胞に T3SS-2 エフェクター欠損株を感染し観察する予定であるが、実験条件、材料など新たに構築する必要がないため、スムーズにデータが得られることが予想される。

7. 達成度（何れかに○）

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

「6. 自己評価」に記載したため省略

当初の予定通り、タイムラプス蛍光顕微鏡観察によりネズミチフス菌に感染したマクロファージに細胞死が誘導されていることを視覚的に示すことができたため。

2022 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : The Genetic diversity of Plasmodium malariae and Plasmodium ovale from Republic of Congo

Project number : 2022 – Ippan – 05

2 . Principal investigator : RICHARD CULLETON(Ehime University, Professor)

Joint researcher(s) :

- Nundu Sabiti Sabin(PhD Student Leading Program, Graduate School of Biomedical Sciences, NEKKEN, Nagasaki University)
- Ahuka Steve (Associate Professor University of Kinshasa)
- Kavunga Hugo (Assistant Professor
National Institute for Biomedical Research, Kinshasa, DRC)

3 . Amount decided : 400,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

We performed genetic analysis on samples of *P. ovale* spp. and *P. malariae* collected from asymptomatic and malaria symptomatic individuals in Kinshasa, the Democratic Republic of Congo. Dr Sabin Nundu has collected more than 80 samples of each species from this location. We analyzed the genetic diversity of both species genes associated with drug resistance, which will inform treatment protocols for these species.

(2) Research content

Samples of *P. malariae* and *P. ovale* were collected by Dr Sabin Nundu. Professor Taro Yamamoto and Dr Sabin Nundu, both of the Department of International Health and Medical Anthropology, NEKKEN, have published four previous reports on these samples in collaboration with Richard Culleton, mainly concerning *P. falciparum*. We performed further analysis of the former two species. We will multiple genes linked to drug resistance. These findings will i) contribute to our currently scant knowledge of the genetic diversity of *P. ovale* spp. and *P. malariae*, ii) inform drug protocols to combat them.

(3) Expected results

We hoped for the successful characterisation of numerous genes of both *P. ovale* spp. and *P. malariae*. We hoped to produce one of the first reports on the genetic diversity of these parasite species, and pioneer the use of population genetics to their study. We hoped to achieve the first population-based analysis of the degree of drug resistance in these species.

5 . Implementation report :

(1) Circumstances of Implementation against the FY2022 Implementation Plan

- Materials

Blood samples were collected from asymptomatic and symptomatic school-age children living in rural and urban areas in Kinshasa, Democratic Republic of Congo, and spotted onto Whatman 903™ filter paper (Whatman plc, UK) for PCR analysis. Whatman 903™ filter papers containing blood samples were dried and stored in individual plastic bags containing desiccant and stored at -20°C before transportation to Nagasaki University for PCR analysis. DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 50 µL of the provided buffer.

- Methods and Procedures

DNA samples were amplified by nested PCR using primers targeting the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (*cox3*) gene using the protocol described by Isozumi *et al* (1) for identification and genotyping of plasmodium species. PCR products were visualized under UV light on 2% agarose gels run at 100 volts for 30 minutes and stained with Gel Red® solution for 30 minutes.

The DHFR genes of *P. malariae* and *P. ovale* samples were subsequently sequenced to identify mutations that may be associated with reduced sensitivity to pyrimethamine and other anti-folate drugs.

(2) Results (results & observations)

The overall prevalence of *Plasmodium* spp. by microscopy, RDT and PCR was 33%, 42% and 62% among asymptomatic children and 59%, 64% and 95% in

symptomatic children, respectively. The prevalence of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* spp. by PCR was 58%, 20% and 11% among asymptomatic and 93%, 13% and 16% in symptomatic children, respectively.

We were able to amplify the DHFR gene from 21 isolates of *P. malariae*. Unfortunately, due to low DNA concentrations and quantities, we have not yet been able to amplify other genes from these species. We are attempting to overcome this by selective whole genome amplification, and have had some positive results with this technique to date.

The amplification of genes from *P. ovale* samples is ongoing, and faces the same issues as above. Several DHFR sequences have been produced, but are awaiting analysis.

P. malariae DFHR mutations

Despite the fact that anti-folates are not used for the treatment of *P. malariae* malaria, we found significant selection for mutations orthologous to those observed in *P. falciparum* (Table 1). This suggests that *P. malariae* has been subject to anti-folate drug pressure, presumably through association with *P. falciparum*, either in mixed species infections, or as a consequence of the presence of anti-folates in the host population, due to the drug-resistant strain of *P. falciparum* still circulating in the study areas. Despite this, the prevalence of DHFR mutations was higher in the *P. falciparum* population than in the *P. malariae* population

Table 1. Mutations in the DHFR genes of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum*

P. malariae

Amino Acid Position	N50K	K55E	S58R	S59A	S114N	F168S	I170M
Wild Type	18	21	8	21	6	21	21
Mutant	3	0	13	0	15	0	0

*F57L was also observed in three samples

P. falciparum

Amino Acid Position	A16V	C50R	N51I	C59R	S108N	I164L
Wild Type	20	21	1	4	0	21
Mutant	0	0	20	17	21	0

(3) Announcement of results

These results are no yet ready to be published. We need more data before preparing a publication

6 . Self-evaluation

The project is progressing well, but slowly. We had some trouble amplifying DNA from the *P. malariae* and *P. ovale* samples due to low DNA concentrations and quantity. Furthermore, attempted species-specific whole genome amplification of mixed infections yielded a large proportion of *P. falciparum* genomes, rather than the target species genomes. We are currently working to get around these issues.

7 . Attainment level (circle one of I to IV below)

I (Few expected results were achieved.)

II (Not fully satisfied, but certain results were achieved.)

III (The expected results were attained with full satisfaction.)

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation (this may be omitted if you have already done so in 6 above)

Please see above.

令和 4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：集団食中毒事例から分離されたナグビブリオのゲノム特性と病原性解析

課 題 番 号：2022-Ippan-06

2. 代 表 者：(国立感染症研究所・主任研究官) 森田昌知

共 同 研 究 者：(長崎大学熱帯医学研究所細菌学分野・教授) 児玉年央

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

Vibrio cholerae に属する細菌のうち、血清型 O1、O139 以外のはナグビブリオと呼ばれ、発展途上国（インド亜大陸、東南アジア、アフリカ、中南米）などで経口性下痢症の原因菌として日常的に分離される。ナグビブリオは、他の下痢症を引き起こすコレラ菌や腸炎ビブリオなどのビブリオ属細菌とは異なり、病原性関連遺伝子の保有プロファイルに関する報告があるものの、それらの網羅的な探索及び病原性への関与に関する評価は行われておらず病原性機構は不明である。そこで本研究課題では、集団食中毒事例の原因菌として推定されたナグビブリオについて、他のナグビブリオやビブリオ属菌を用いた比較ゲノム解析により下痢原性に寄与する因子の同定を試み、さらにその因子の性状解析を行うことでナグビブリオによる下痢症の発生メカニズムを明らかにすることを目的とする。

② 研究内容

3 型分泌装置関連遺伝子群の病原性については腸炎ビブリオを用いた解析で実績のある児玉年央教授（対応教員）の指導のもと実施する。腸炎ビブリオでは 2 セットの 3 型分泌装置遺伝子群（T3SS1 と T3SS2）が存在し、それぞれが異なる病態（敗血症と下痢症）に関与している。全ゲノム解読情報から血清型 O144 ナグビブリオの保有する 3 型分泌装置遺伝子群は T3SS2 に属することが明らかとなったが、児玉研究室がもつ解析系であるウサギ結紮ループ試験、マウスの腹腔内投与による致死活性、細胞毒性、細胞変性活性は、ヘモリジンの存在下では 3 型分泌装置依存的な病原性が正しく評価することができない。そこで、まずはヘモリジン遺伝子の欠損株の作製を行う。この際に原因菌とした血清型 O144 ナグビブリオだけでなく、他の血清型の分離株についても同様に処置し対照実験に用いる。ヘモリジン遺伝子を欠損させた血清型 O144 ナグビブリオについては、さらに 3 型分泌装置関連遺伝子を欠損させた株を作製し、各欠損株は病原性解析系により表現型を評価する。病原性の関与が認められた遺伝子欠損株については、遺伝子相補株も作製し病原性解析を行う。また、病原性関連遺伝子のリコンビナントタンパク質発現系を用いて抗

血清を作製し、遺伝子発現解析に備える。血清型 O144 ナグビブリオの 3 型分泌装置関連遺伝子群は 37 個の ORF を含む約 30kb の genomic island であり、それらから欠損の標的とする遺伝子を選定することは困難である。児玉教授は、これまで腸炎ビブリオの 3 型分泌装置の機能解析を分子レベルで明らかにしてきたことから、血清型 O144 ナグビブリオの 3 型分泌装置関連遺伝子群の欠損株の作製においても、候補とすべき遺伝子の提案を行うことができ、研究の進捗への寄与は大きい。また、これまでに児玉教授が収集し保管されている他のナグビブリオ株やビブリオ属菌、抗血清といったバリオリソースや病原性解析系は、本研究課題を遂行する上で必須であると考えている。

③ 予想される成果

2021 年度研究課題では、全ゲノム解読情報を基盤とする研究成果により本事例で分離された菌株の中で血清型 O144 ナグビブリオだけが 3 型分泌装置遺伝子群を保有していること明らかとなり、その病原性への関与が示唆された。研究の過程で血清型 O144 ナグビブリオ 1 株の完全長ゲノムを決定したことから、**Microbiology Resource Announcements** 誌への投稿準備は完了している。さらに、2022 年度研究課題では、血清型 O144 ナグビブリオの 3 型分泌装置遺伝子群の機能解析と発現機構が分子レベルで明らかとなることが期待され、本菌の病原性の解明につながる。また、パンゲノム解析を用いた血清型 O144 ナグビブリオに特異的な遺伝子探索では、既知の病原性遺伝子との相同性解析では発見することのできない機能未知な遺伝子を候補とすることができ、下痢症を引き起こすビブリオ属細菌の新たな病原因子の発見につながることを期待できる。これらの知見を包括的にとらえることで、下痢発症メカニズムの解明につながるだけでなく、病原性遺伝子マーカーとして利用も可能となり、病原性株の新規検出・診断法の開発に応用できる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

ヘモリジン遺伝子の欠損株は、集団食中毒の原因菌である血清型 O144 ナグビブリオと原因食材より分離された他の血清型（O21、O49、O90）のナグビブリオを用いて作製することができた。また、3型分泌装置の構造体遺伝子を欠損させた血清型 O144 ナグビブリオについては、ヘモリジン遺伝子を欠損させたうえで計画通りに作製することができた。各種欠損株を用いた病原性解析については、全てのヘモリジン遺伝子欠損株が溶血活性を失っていることを確認できたが、その他の解析については実施できなかった。

② 成果（結果＋考察）

集団食中毒事例から多様な血清型のナグビブリオが分離されたが、それらの中で原因菌とされた血清型 O144 ナグビブリオだけが3型分泌装置遺伝子群を保有していた。このことから3型分泌装置の病原性への関与が考えられたため、3型分泌装置関連遺伝子群の欠損株を用いた解析により、その病原性を評価することを試みた。しかしながら、ビブリオ属細菌は普遍的にヘモリジンを保有しており、ヘモリジン存在下では3型分泌装置依存的な病原性は正しく評価することができない。そこでまず、ヘモリジン遺伝子を欠損させたナグビブリオを作製した。また病原性解析における対照実験に用いるため、3型分泌装置遺伝子群を保有する血清型 O144 ナグビブリオだけでなく、それらを持たない血清群 O21、O49、O90のナグビブリオも対象菌株とした。

昨年度までにヘモリジン遺伝子を欠損させるためのノックアウトベクターを構築していたので、エレクトロポレーションによりナグビブリオへ導入を試みた。しかしながら目的とする欠損株を得ることができなかった。そこで、感染研細菌第一部で開発したキチン誘導性の自然形質転換により欠損株の作製を行った。具体的にはエビ殻入りの人工海水培地で培養し、ナグビブリオの持つ自然形質転換能を誘導した。その後、ヘモリジン遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換するための遺伝子断片を培養液中に添加し、ナグビブリオに取り込ませることで欠損株を得ることができた。得られたヘモリジン遺伝子欠損株を血液寒天培地上で発育させたところ、野生型株で見られた溶血環が消失しており、ナグビブリオの持つヘモリジン由来の溶血活性が失われていることが確認できた（図1）。

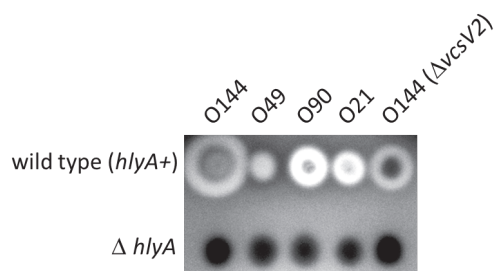


図1 野生株とヘモリジン遺伝子（*hlyA*）欠損株の血液寒天培地上の溶血反応

また血清型 O144 ナグビブリオについては3型分泌装置の病原性を評価するため、同様の方法で3型分泌装置の構造体遺伝子（*vcsV2*）をカナマイシン耐性遺伝子で置換した3型分泌装置遺伝子欠損株を作製した。3型分泌装置依存的に分

泌されるタンパク質
VspB の局在を児玉
 研究室で作製した抗
 血清を用いたウェス
 タンブロッティング
 により確認した（図
 2）。その結果、野生
 型株では分泌タンパ
 ク質が培養上清中で
 検出された一方で、

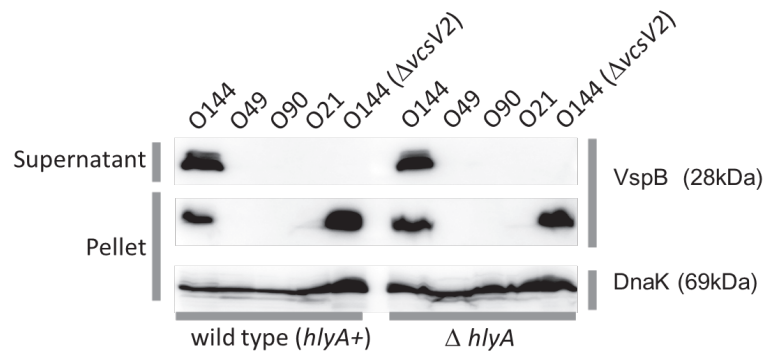


図 2 3 型分泌装置依存分泌タンパク質 (VspB) の局在

欠損株では培養上清には検出されず、菌体内に存在していることが確認された。
 今後、各種病原性解析系により表現型を評価する予定である。

- ③ 成果の公表
 該当なし

6. 自己評価

本研究課題では集団食中毒の原因菌である血清型 O144 ナグビブリオの持つ 3 型分泌装置の病原性評価を目的としている。ヘモリジンの存在下ではその病原性を正しく評価することができないことから、ヘモリジン遺伝子を欠損させることが必須となっていた。今年度、血清型 O144 ナグビブリオだけでなく、対照実験に用いる他の血清型のナグビブリオについてもヘモリジン遺伝子を欠損させることができたことは評価できる。また血清型 O144 ナグビブリオについては 3 型分泌装置の構造体遺伝子も欠損させた株を得ることができた。また、感染研細菌第一部で開発した手法により作製した遺伝子欠損株の表現型を児玉研究室で作製した抗血清を用いて確認することができ、双方で補完することで共同研究を進めることができた。しかしながら、実際の病原性解析までは至らず、目的の達成はできていない。以上のことから、達成度は II とする。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ヒト住血吸虫に対する中間宿主巻貝の感染耐性の理解に向けて
課題番号：2022-Ippan-8

2. 代表者： 中部大学先端研究センター・特任教授 黒田玲子
共同研究者： 長崎大学熱帯医学研究所・教授 濱野真二郎
長崎大学熱帯医学研究所・技術職員(有期) 濱崎めぐみ
中部大学先端研究センター・特任講師 内田孝幸
中部大学先端研究センター・博士研究員 大沼耕平

3. 決定額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

世界で2億人以上が罹患し、WHO指定の顧みられない熱帯病（NTDs）であるヒト住血吸虫症の制御を目指す。住血吸虫はまず中間宿主の淡水産巻貝に感染して巻貝内で変態し、セルカリア幼生となって淡水に遊出してヒトに経皮感染する。セルカリア遊出を抑えることでヒトへの感染を防ぐ。天然の感染耐性系統が実験室系統（BS-90）として樹立されており、セルカリアを遊出しないメカニズムを分子レベルで解明することを最終目的とする。本研究では、感染感受性系統（M-line）、感染耐性系統（BS-90）におけるマンソン住血吸虫の体内動態を比較し、また、2系統の交配、戻し交配実験から感染耐性を規定する候補遺伝子を絞り込み、その後のゲノム編集実験につなげる。無脊椎動物の免疫機構（自然免疫のみ）はほとんど明らかになっていないが、これが耐性の鍵を握るという仮説に基づいて考察し理解を深める。

② 研究内容

ゲノム編集の標的とする *B. glabrata* の感染耐性遺伝子の候補を絞り込み、また、免疫機構を明らかにする。感染感受性系統・耐性系統の感染度の相違が巻貝の体内のどこでどの段階で起きるのかを、時間を追った寄生虫の観察実験を引き続き行い明らかにする。さらに、蛍光標識したミラシジウムを用いた観察などに展開する。感受性貝、耐性貝両系統の交配による F1 世代、F1 の自家受精あるいは戻し交配による F2 世代(個別飼育)の感染実験においては、まず、遺伝学的に感染系統の貝が確実に感染する実験条件の検討が不可欠である。また、飼育中の死亡率を低下させて統計的に扱えるようにするなど昨年度の経験をもとに改善する。それが確立されたら、交配・戻し交配世代の感染実験を行う。

マンソン住血吸虫の感染実験は、動物実験施設（P2）を有し、寄生虫の生活環を常時回し、各種顕微鏡がそろい、専門分野の教職員がおられる貴研究所でなくてはできない。

③ 予想される成果

淡水産巻貝の住血吸虫に対する感染感受性・耐性に関係した候補遺伝子が数多く報告されているが、確定されたものは一つもない。感受性、耐性系統巻貝体内での感染実態を明らかにすることで、鍵となる候補遺伝子がある程度狭めることが可能になる。また、感染感受性、耐性の差を生む遺伝子の同定には、連続戻し交配実験と連鎖解析を行うのが理想的であるが、膨大な人手と資金、時間が必要であるので、現況では現実的ではない。そこで、感染感受性と耐性巻貝の2系統の交配でF1世代を得、F1の自家受精あるいは感受性系統との戻し交配によるF2世代を作成し、感染実験を行うことで、感染度に大きな変化が見られた系統を樹立できれば、その後の遺伝子レベル研究に展開できると期待している。

5. 実施報告

① 令和4(2022)年度実施計画に対する実施状況

胚外人工培養法 (EOC)

耐性系統 **BS-90** と感受性系統 **M-line** それぞれの1-2細胞期胚を用いてさらに人工胚培養の成功率を上げるための様々な条件検討を行った。

マイクロインジェクション

近縁の *Lymnaea stagnalis* (ヨーロッパモノアラガイ) で確立されているマイクロインジェクション法を参考にして、1細胞期胚の前処理条件を検討した。インジェクションには低分子量の蛍光物質 **Lucifer Yellow** および **EGFP mRNA** を用いた。

耐性・感受性貝交配実験および感染実験

耐性系統 **BS-90** と感受性系統 **M-line** 1個体ずつをペアで一週間程飼育後、隔離した **M-line** から採卵した。**M-line** がアルビノであることを利用し、すべての交配実験では稚貝の時期に、交配により産まれた眼点の明確な貝のみを選別した。生後1ヶ月前後の **BS/M-NN-F1** (以降 **F1** と表記) 貝20匹を用いて感染実験を行った。**F1** 貝は **M-pure F0** に戻し交配し、隔離した **M-pure F0** から **F2** を得た。個別飼育した **F2** から自家受精により得られた **F2-self** を用いて感染実験を行い、耐性と判定した **F2** の2個体を **M-pure F2** に戻し交配を行った。得られた **F3** の20個体を **M-pure F3** にさらに戻し交配を行った。現在、得られた **F4** を用いて感染実験を開始した段階である。

② 成果 (結果+考察)

胚外人工培養法 (EOC)

1-2細胞期の胚から開始して成貝まで成長させることができたものは全てが自家受精により次世代を生み出す生殖能力を持つことが確認された (図1)。これはゲノム編集により標的遺伝子に変異の起こった貝を得るための重要な第一歩である。

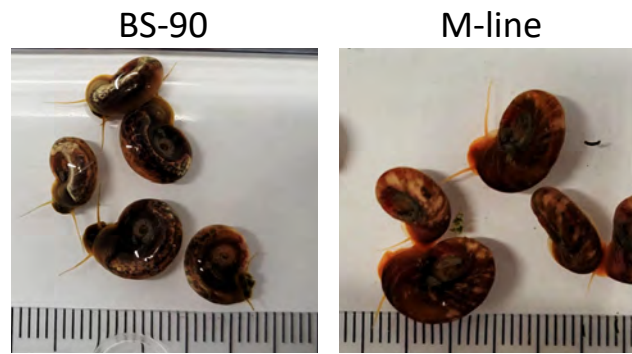


図 1. 人工胚培養貝 F0 から産まれた F1 (共に成貝)

マイクロインジェクション

当初は *L. stagnalis* 胚を用いたマイクロインジェクション法を参考にしたが、装置の改良等により DTT 処理を行わずに *B. glabrata* 胚へのマイクロインジェクションが可能となった。2細胞期の片方の割球に *EGFP mRNA* を注入して人工胚培養を行ったところ、発生の進んだ胚の片側でのみ *EGFP* の蛍光が確認された。

耐性・感受性貝交配実験および感染実験

耐性貝 BS-90 と感受性貝 M-line の交配により得られた F1 貝 20 匹を用いた感染実験で生存した全ての個体が耐性であることが確認された。2021 年度の感染実験では約 60% (254 匹中 151 匹) が死亡したため感染耐性・感受性を正しく評価することが出来なかった。2022 年度は飼育方法を改良したことで実験中の死亡率を 4% (114 匹中 5 匹) にまで下げることが成功し、感染実験結果を正しく評価することが出来るようになった。7 匹の F2 由来の F2-self の感染実験により耐性貝 2 匹 (F2-b16, b39) を選択し (図 2)、M-pure F2 に戻し交配を行った。得られた 20 匹の F3 をさらに M-pure F3 に戻し交配して得られた 64 匹の F4 (8 系統から 8 匹ずつ) を用いて感染実験を開始した (図 3)。2021 年度に実施していた交配実験では F3 を得るまでに約 1 年 (1 世代あたり 4 ヶ月) を要していたが、交配・感染実験計画を見直して実施した結果、8 ヶ月で F4 (1 世代あたり 2 ヶ月) を得るまでに大幅に加速させることが出来た。

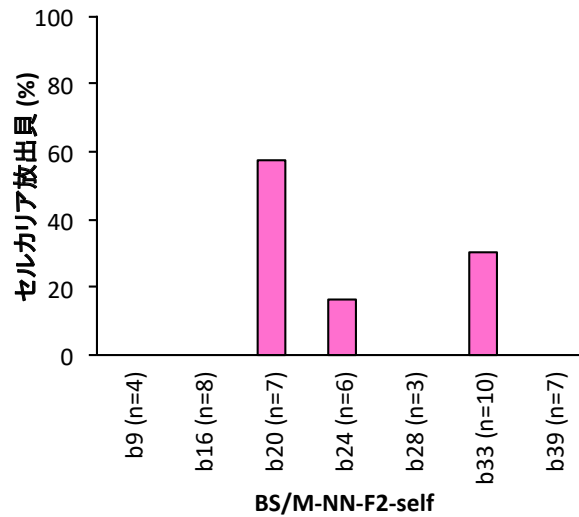


図 2 . BS-90 ・ M-line 交配員の感染実験結果

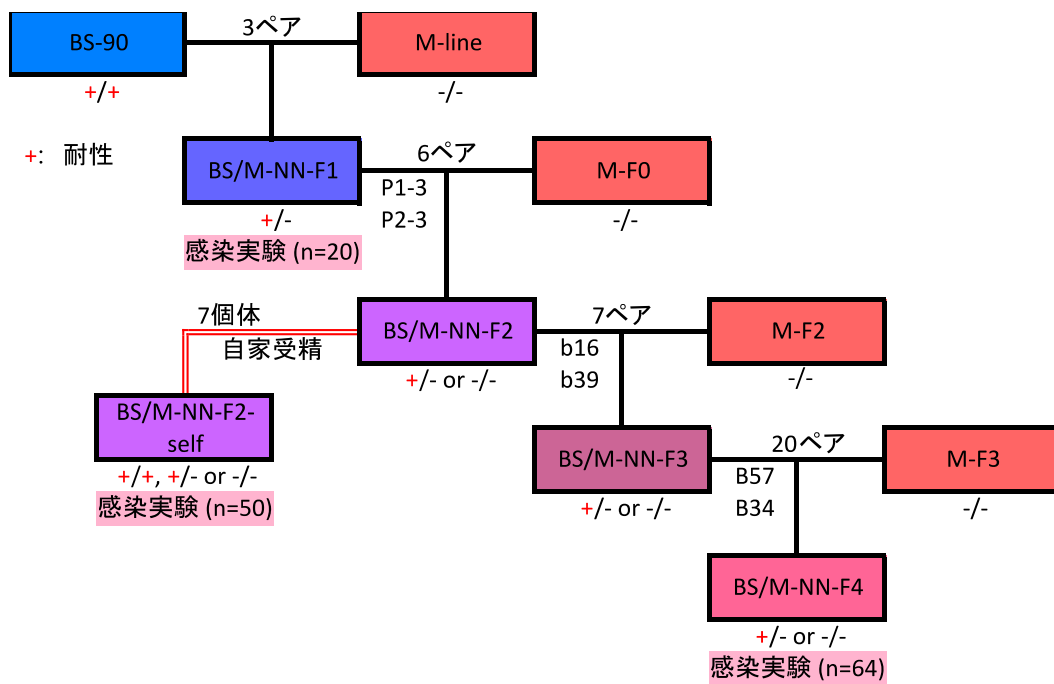


図 3 . BS-90 ・ M-line 交配 ・ 感染実験の概略

③ 成果の公表

本研究は多くの段階がある長期間にわたる性格のものであり、どの段階も挑戦的である。さらに、世界での競争が大変に厳しくなっている。研究成果の全体像が見えてきたら直ちに公表したいと考えている。

6. 自己評価

2022年度は飼育方法を改良したこと、交配・感染実験計画を見直して実施した結果、実験中の死亡率を大幅に低下させることができ、また、8ヶ月でF4（1世代あたり2ヶ月）を得るまでに大幅に加速させることが出来た。遺伝学的に感染系統の貝が確実に感染する実験条件を確立できたと考えられ、このまま連続戻し交配を続けていけば、その後の遺伝子レベル研究への展開が可能となると考えている。

胚外人工培養法 (EOC) に関しても、1-2細胞期の胚から開始して成貝まで成長させることができ、全てが自家受精により次世代を生み出す生殖能力を持つことが確認できた。また、2細胞期の片方の割球に *EGFP* mRNA を導入し、その後に胚の片側でのみ *EGFP* の緑色蛍光が確認された。これらの実験結果は、ゲノム編集により標的遺伝子に変異の起こった貝を得るための重要な第一歩であり、大きく前進させることができた。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- Ⓒ （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：肝内型マラリア原虫における脂質分子リクルート機構の解明
課題番号：2022-Ippan-09

2. 代表者：（国立感染症研究所・任期付研究員）荒木 球沙

3. 決定額：400 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究では肝内期マラリア原虫のバイオロジーの解明に向けて、①原虫の急速な増殖をサポートする宿主細胞から原虫への脂質供給システム存在を明らかにし、②DGAT や perilipin 2 (Plin2) など複合体形成に関わる分子のノックアウト肝細胞を用いて、複合体形成の異常や変化、これらが原虫の増殖にどのように影響するのかを解析する。さらに③外部よりのラベル付きの脂質を添加（リン脂質、コレステロール、脂肪酸）することにより供給される脂質分子組成を解析することによって分子種による供給度の違いや原虫にとっての必要性を明らかにする。これらにより、脂質分子を供給しているオルガネラの種類、複合体形成に必須な分子機構を解明し、肝ステージにおける寄生現象の新たなモデルを構築する。これらの知見は今後の肝ステージをターゲットにした薬剤開発にも重要な情報となる。

② 研究内容

1. マラリア原虫感染肝細胞における脂肪滴の形成と原虫の増殖の関係を明らかにする（1年目）

肝細胞の脂肪滴は細胞外の脂質量に大きく影響されるため、次の2条件において我々の作成したmCherry発現スポロゾイト（ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei*）の感染実験を行う（感染研）。①培地にオレイン酸（C18:1）等を添加し、強制的に脂肪滴量を増加させたHuh7細胞 ②培地に含まれる血清を少なくし脂肪滴の発生を抑えたHuh7細胞。これらの条件にて感染後、固定し原虫の増殖と脂肪滴-PVMの相互作用を熱帯医学研究所の超解像共焦点レーザー顕微鏡で解析する（脂肪滴はLipid-Greenなど中性脂質を特異的に染色する蛍光アナログを用いて染色）。

1: マラリア原虫感染肝細胞における脂肪滴・オルガネラ複合体の動態解析と脂肪滴形成の観察（1年目）

マラリア原虫が感染した肝細胞において、PVM周辺でのオルガネラと脂肪滴の複合体形成を観察する。この系の存在を確認するため、感染肝細胞の脂肪滴や各種オルガネラを蛍光プローブで標識し、共焦点レーザー顕微鏡（熱研）を用いて詳細な局在観察を行う。また感染細胞における脂肪滴の数や量の定量解析も行う。

2: 脂肪滴・オルガネラ複合体形成タンパク欠損細胞におけるマラリア原虫の増殖測定 (1-2年目以降)

脂肪滴との結合に関わるタンパク質として、小胞体は diacylglycerol acyltransferase 2 protein (DGAT2) や seipin、リソソームは perilipin 2 (Plin2)、Rab7、ミトコンドリアは mitoguardin 2 (MIGA2)、Plin5 などが知られている。このうち DGAT2、Plin2、Plin5 の 3 つの遺伝子をそれぞれノックアウト (KO) した肝細胞に、蛍光タンパク質を発現するネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) を感染させる。次に感染細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、複合体形成の異常と原虫の増殖率を測定する。この実験により、どのオルガネラと脂肪滴の複合体が原虫の増殖において重要か明らかにする。最後に複合体形成タンパクの欠損細胞における、脂肪滴・オルガネラ複合体への影響を超解像度顕微鏡、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて確認する (熱研、感染研)。

3: 脂肪滴から原虫への脂質流入の観察(機能的解析) と脂質解析 (2年目以降)

a. 脂肪滴・オルガネラ複合体⇄マラリア原虫における脂質分子の流入は以下の方法で解析する。感染細胞における脂肪滴内の中性脂質を Lipid-Green、脂質膜を Di-4ANEPPDHQ で別々に染色し、Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) 法により、消光した部分に流れ込む蛍光を観察する。これにより中性脂質とリン脂質の流入と速度の解析を行う。

b. 感染細胞内の脂質組成を、2 で特定した複合体形成タンパクの欠損細胞に原虫を感染させたものと、正常細胞に原虫を感染させたものとで比較する (熱研)。脂質組成の解析には LC-MS/MS を用いる。

c. 外部より重水素ラベルした各種脂肪酸 (またはリン脂質) を非感染細胞培養に添加し、その後感染⇒感染細胞を固定、ラマン顕微鏡で脂肪酸の局在と定量を行う。これにより、原虫に取り込まれやすい脂質を特定できる。

この一連の解析により、脂肪滴・オルガネラ複合体が原虫の脂質組成にどのような影響を与えるのか明らかにし、肝内期原虫の急速な増殖をサポートする脂質供給モデルを確立する。

③ 予想される成果

肝内期マラリア原虫と脂肪滴・オルガネラ複合体間の脂質動態を調査する事で、詳細不明である肝内期原虫のバイオロジーの一端を解明するとともに、肝臓がヒトで最初の感染ステージの場として選択された理由を明らかにすることができる。また、以上のような肝内期原虫に対する基礎知識の蓄積は、肝内期マラリアに対する新たな予防薬やワクチンの開発に繋げる事ができる。ヒトマラリア原虫は肝臓で増殖を行ったあと、赤血球に感染して臨床症状を示すようになるが、肝内期マラリアに対する有効な治療法は確立されていない。以上のことから、本研究がマラリア治療に対して与える影響は大きいと考えられる。本研究の本研究によって同定された原虫の増殖制御に関わるタンパク質は肝内期マラリア治療の有望な研究ターゲットとなることが期待される。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

現在、マラリア原虫感染肝細胞における脂肪滴の形成と原虫の増殖の関係を明らかにすることを目的とし、脂肪滴量を人為的に変化させた肝細胞にネズミマラリア原虫（*Plasmodium berghei*）を感染させて、原虫の増殖速度を共焦点レーザー顕微鏡（熱研）を用いて調査した。また、宿主脂肪滴から原虫への中性脂質の取り込みが起きることを明らかにするため、脂肪滴がリクルートされていると思われる原虫寄生胞数を共焦点レーザー顕微鏡下でカウントした。

② 成果（結果＋考察）

脂肪滴量を人為的に変化させた肝細胞にネズミマラリア原虫（*Plasmodium berghei*）を感染させて、原虫の増殖速度を調査した。方法としては、①培地にオレイン酸を添加し脂肪滴を増加させた Huh7 細胞、または②培地に含まれる血清を減らして脂肪滴の発生を抑えた Huh7 細胞に mCherry 発現スポロゾイトス感染させた。次に感染後 18 時間と 24 時間で細胞を固定した後、原虫の増殖を共焦点顕微鏡で解析した。結果、コントロール群と比較して、①と②の間で、原虫の増殖に有意な差は認められなかった。この結果は、人為的に脂肪滴量を変化させても、原虫の増殖に影響を与えないことを示唆している。また、宿主の脂肪滴成分を原虫が自身の増殖ために利用している場合、原虫の寄生胞膜（PVM）近傍に脂肪滴がリクルートされる必要があると考えられる。この仮説を確かめるため、脂肪滴が接触している PVM と接触していない PVM の数をカウントしてその割合を算出した。結果感染から 18 時間、24 時間の双方において、90%超の PVM に脂肪滴を接触していた。この結果は、原虫が宿主脂肪滴をリクルートしていることを示唆している。

③ 成果の公表

なし

6. 自己評価

本研究は原虫の増殖と脂質要求性の関係を調べた新しい視点を与えるものである。脂肪滴の蓄積量の増大は、過剰な脂質の一時的待避と貯蔵であり、この条件で原虫の増殖に大きな変化が見られなかったのは通常の状態でも脂質供給量は十分であることが確認できた。一方、脂肪滴と PVM の接着率が上がっていることにより原虫の増殖に寄与している可能性が見いだされたのは興味深い。この事実は、脂肪滴－PVM のコンタクトに関わるタンパク質による脂質供給ルート形成機構の研究の第一歩となり、本共同研究が大きなサポートとなったと言える。

本研究は、蚊の飼育から肝細胞への感染という技術的に高度なステップをいくつも含んでおり、頻繁に実施できるものではない。当初の計画にある、脂肪滴に存在するいくつかのタンパク質の KO までには到達できなかったが、限られた時間の中で上記の知見が得られたのは良い結果と言える。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ポストコロナ時代の新しい近接性：共生のための環境デザイン
課 題 番 号：2022-Ippan-11

2. 代 表 者：松本文夫（東京大学総合研究博物館・特任教授）
共 同 研 究 者：鶴見英成（放送大学教養学部・准教授）
永井慧彦（東京大学総合研究博物館・特任研究員）

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究は近接性という視点をもとに人間と自然の共生のあり方を再考し、新しい環境デザインを創出することを目的としている。コロナ禍の現代社会で起きているさまざまな現象、たとえば業務や教育の遠隔化による引きこもり、対面交流の不足による孤独や無理解、建築類型の機能的な無効化、三密回避による施設の空洞化といった問題に対して、近接性の柔軟な適用によって、人間どうしのつながりを回復し、新しい社会環境の姿を描ければよいと考えている。このような目的を達成するために、次項②に示すような3つの段階と作業目標を設定している。

② 研究内容

本研究は三つの段階を経て進行する。第一に、公衆衛生学の課題である「人間とウイルスの共生」について、感染症のアーキテクチャを解明し、ウイルスの目線に立って人間と自然の共生を見直す（→多様な要素の抽出）。第二に、現代の人間社会の課題である「近接性の再構築」について、「距離」と「つながり」の視点から、共生が成立する相互関係性を考察する（→要素の関係性の把握）。第三に、共生と近接性の検討を統合した「デザインの創出」について、空間・展示・アート作品等の博物館学的なデザイン成果として結実させる（→関係性の実体化）。「共生」の検討は長崎大学、「近接性」の検討は東京大学/放送大学のイニシアチブとしつつ、常に両方で意見交換をしながら並行して進めていく。研究期間は3年間を想定している。第一・第二段階は最初の2年度に、第三段階は3年度に実行する。

③ 予想される成果

本研究の目的である「新しい環境デザインの創出」とは、空間・展示・アート等の博物館学的なコンテンツを生み出すことである。博物館学的なコンテンツとは、収集保存・展示公開・創造生成の対象となるような文化資源である。研究者らの学術研究によって共生への理解と近接性の検討が進んだあとで、その成果を共有可能な形ある

ものとして具現化する。環境デザインの成果として、たとえば空間系であれば社会環境の空間類型のプロトタイプ模型（2021年に1点製作）、展示系であれば近接性に考慮した展示プログラム（2020年に1件製作）、アート系であればポストコロナの社会状況を反映したインスタレーションなどが考えられる。コンテンツの具体的な内容と数量は現時点では確定できないが、研究成果を明確に可視化し、幅広く共有・理解・体験できる仕組みとする。別途、研究報告書を提出する。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

本研究では、第一に感染症のアーキテクチャの解明を通して「人間とウイルスの共生」のあり方を探究し、第二に現代社会の課題の一つである「近接性の再構築」の可能性を検討し、第三にそれらを統合した博物学的な成果としての「デザインの創出」を長崎の地で実践する。これらの三段階の研究を三年がかりで進めることを想定してきた。2022年度においては、第一・第二段階の基礎的検討を行うとともに、第三段階の実践の場となる長崎大学および長崎に関する情報収集を行った。以下に2022年度の研究経過を報告する。なお文中では、東京大学総合研究博物館を「総博」、長崎大学熱帯医学研究所を「熱研」と記す。

1) 山本氏・松本・鶴見による共同研究活動：①熱研における博物館等施設確認および「人間とウイルスの共生」に関する意見交換、ならびに長崎の現地調査を行った（2022年7月）。②熱研における「人間とウイルスの共生」および「近接性の再構築」の相関的な研究アプローチに関する協議ならびに長崎の現地調査を行った（2023年3月）。

2) 松本による研究活動等：①日本建築学会情報設計小委員会における「新しい近接性」をテーマとした研究活動。②科研費・基盤研究C「近接性の再構築にもとづくポストコロナの空間デザイン」における近接性によるデザインの研究。③総博における特別展示「空間博物学の新展開／UMUT SPATIUM」における「近接性の空間」を示す社会理念モデルの制作と展示。

3) 鶴見による研究活動等：①山本氏の総博における講演企画「感染症のアーキテクチャ(仮題)」の企画構想を起点とするテーマ展開の検討。②科研費・新学術領域研究「人工的環境の構築と時空間認知の発達」における山本氏との共同研究の実施。

研究経過の進捗としてまとめると、松本は「近接性」に関わるデザインの概念設定を行い、鶴見は文明史的な視点から対象環境の調査検討を行い、山本氏は「感染症」および「共生」に関わる問題提起を行った。そして3者によって「共生と近接性」に関わる新たな「デザインの創出」を具体化するための、情報共有および総合的な検討を進めてきた。長崎という日本の近代文明の揺籃の地において、熱研という大学の研究拠点を中核として、「共生」という基本理念をもとに、新時代の環境デザインを具現化するための基礎的な議論を行った。

② 成果（結果＋考察）

長崎には古代からの大陸との国際交流があり、中世以来のヨーロッパとの接触がある。その上に先端的な医学が展開されているということで、長崎大学じたいが地域史ときわめて密接に関係していることに注目した。日本の近代化が国家レベルで本格的に展開する前に、長崎という先端的な場所で、地域と密接に交流しながら、海外から導入された学問や文化が進歩してきた。このことを現在の視点から逆にとらえると、熱研において山本氏が世界に向けて発信/実践されていることにもつながっている。長崎は江戸/東京とは異なるタイプの濃密な知の蓄積・発信拠点であることは、本研究を進める上で重要な共通認識であることを確認した。

そのうえで2022年度の研究においては、研究の基本理念について関係者で考察を重ね、以下のような方向性を確認した。

1) 共生の解釈：「ウイルスとの共生」を人間の文明史的視点から再解釈し、ポジティブな意味付けをあたえる。社会からのウイルスの排除ではなく、共存のあり方を探る。その検討は、「生態系における共生」というより広汎な理念に通じるはずである。

2) 近接性の構築：人間どうしの近接性（＝距離とつながり）に関するポリシーを提示する。「場所としての空間」と「関係としての空間」を想定し、それらの「連結と分離」によって、従来の建築類型とは異なる新たな空間タイプのネットワークを創出する。

3) 尺度の自在：微小な現象がグローバルに拡散しうる尺度のダイナミズムが現代社会の特徴である。「ウイルスの目線」で考え、「地球の規模」で想像することが求められる。身体スケールに固定されない、柔軟な視点からデザインの哲学をもつこと。

4) 形象の記憶：博物学的な成果を志向する場合、言語による理解と並行して、カタチとして感覚に訴えるイメージを獲得することも必要になる。AIによる高度な自然言語処理が可能になったが、形象の豊かさを蓄積し、構成・活用することも考えたい。

5) 感染の体感：研究成果としての展示や作品を体験することで、何かに「感染」して帰る。そしてそれを伝播・拡散したくなる。「感染」という言葉をポジティブにとらえ、文化が新たに共有される場が生成されることが望ましい。

6) 分散と連携：複数の場所／空間からなる複合的な文化空間群の創成。局所集中型のスタンドアロンの施設から、分散連携型のネットワーク的な施設へとミュージアムのあり方を変容させる。人を介在させることで新たなつながりが生まれる。

7) 大学の革新：本研究から生み出される博物学的な成果は、従来型の大学博物館というよりも、博物館型の大学のイメージを基盤とするものである。「保存と創造」を核としたジェネレータ的な性質を大学全体の新たな基調とすることが考えられる。

8) 熱帯の教訓：熱帯の状況から人間社会は何を学べるか。地球温暖化に備える生存戦略を研究することにより、今後の環境デザインの方向性を提言することをめざす。それは長崎大学に蓄積されてきた学術研究の固有性を継承することに通じる。

9) Born in Pandemic: コロナ禍によって人間社会で失われたものは何か。また新たに獲得されたもの、あるいは新たに生み出されたものは何か。コロナ禍を一過性の現象にとらえずに、長期的な視点から文明の変容と創生をとらえていきたい。

10) 学内文化財の活用：高度感染症研究センターなど坂本キャンパス内の建設事業の際に埋蔵文化財の事前調査がされていると思われる。その出土遺物があれば、研究

や展示のための有力なコンテンツとして活用できる。

1 1) アートとしての表現：感染症の研究は人体メカニズムの解明から防疫にいたる工学的なアプローチでありながら、同時にミクロレベルでの知られざる生命の世界の探検開拓でもある。その感覚に訴える驚きを、アートとして表現していく。

③ 成果の公表

- ・松本文夫「20世紀の建築の設計理念についての集成モデルによる比較考察」日本建築学会学術講演梗概集, E-1 pp33-34, 2022.
- ・松本文夫「身体像の原記載へ」『プロトローグー山中俊治デザインの発生学』東京大学総合研究博物館, pp130-143, 2022.
- ・鶴見英成編『博物館概論』放送大学教育振興会, 2023.
- ・鶴見英成・葉田前章・大山泰宏・佐藤仁美・大森聡一・安池智一・五藤素直・稲村哲也「放送大学資料館（仮）設立の準備と共同研究」『放送大学研究年報』40:93-104, 2023.

6. 自己評価

本研究では、「人間とウイルスの共生」、「近接性の再構築」、「デザインの創出」というテーマをもって3年間にわたる研究を想定した。初年度にあたる2022年度では、研究の全体像に関わる基本的な検討を中心に据え、かつデザインの創出の場なる長崎/長崎大学の調査に力点が置かれた。それぞれのテーマに関連しつつ、研究者の専門分野を横断した重要な議論が行われた。コンテンツの試作検討などの具体的な成果物の創出には至らなかったが、今後の研究展開の布石となる方向性は確認できたと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：熱帯熱マラリアのニーマンピック C1 様受容体の機能解析
課題番号：2022-Ippan-13

2. 代表者：早川枝李（自治医科大学医動物学・助教）
共同研究者：徳舛富由樹（長崎大学熱研・細胞環境構築学・教授）

3. 決定額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究は PfNCR1 本当にかかわっているのか、また未知の機能を持っているのかなど、機能解析も含めて詳細に検討を行う。PfNCR1 の機能を調べるために、Pf-NF54 line 原虫を用いてコンディショナルノックダウン（cKD）やコンディショナルノックアウト（cKO）を作製し、原虫の増殖能や感染赤血球内部の Chol の局在、原虫を包んでいる寄生胞膜（PVM）や赤血球膜におけるリン脂質、Chol の局在について共焦点蛍光顕微鏡等を用いて明らかにする。さらに野生株と cKD, cKO 株における原虫の細胞膜における脂質組成の違いや Chol、リン脂質などの分布を比較検討する。

② 研究内容

1 年目：PfNCR1 の機能を調べるために、本申請研究の熱研側受け入れ教員である徳舛富由樹教授（細胞環境構築学分野）に、Pf 原虫の PfNCR1 に対するコンディショナルノックダウン（cKD）やコンディショナルノックアウト（cKO）の作製を依頼し、その後、原虫の増殖能や Pf 感染赤血球内部の Chol の局在、Pf を包んでいる寄生胞膜（PVM）や赤血球膜におけるリン脂質、Chol の局在について、共焦点蛍光顕微鏡等を用いて明らかにする。

2 年目：初年度に引き続き、野生株と cKD, cKO 株における原虫の細胞膜における脂質組成の違いや Chol、リン脂質などの分布を比較検討する。さらに各細胞株の感染赤血球に対し、Chol アッセイ、リン脂質アッセイなどを用いて細胞内での各脂質フラクションを比較検討する。また可能なら、野生株の PfNCR1 と cKD—PfNCR1 の結晶構造解析を行い、Chol 輸送に対する違いがあるかどうかとも検討したい。

③ 予想される成果

この実験では、PfNCR1 の遺伝子改変原虫を使い Chol や脂質輸送を解析するため、PfNCR1 と細胞内 Chol 輸送の関係が明らかとなる。熱研側の細胞環境構築学分野では、すでに細胞外リポタンパク質が感染細胞特異的に取りこまれるモデルを発表しており、本研究で PfNCR1 の Chol 輸送の機能が明確となれば、細胞外⇒細胞内の原虫への三つの膜を介する Chol 輸送経路の全貌が見えてくることになる。原虫の増殖

に必須な Chol 輸送経路の詳細は、今後の抗マラリア化合物探索に大きく寄与することが予想される。

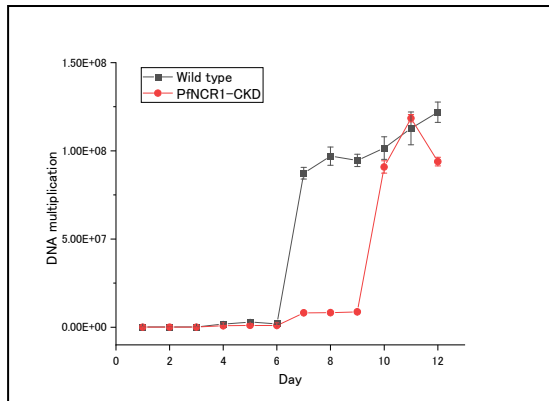
5. 実施報告

① 令和4(2022)年度実施計画に対する実施状況

- (1) 熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*, Pf)のコンディショナルノックダウン(cKD)株を作成し、*P. falciparum* の wild type と cKD 株における増殖能の比較検討を行った。
- (2) 各種脂質、コレステロール(Chol)の蛍光アナログを用いて、野生株と cKD 株における感染赤血球内の局在について、比較検討を行った。

② 成果(結果+考察)

- (1) cKD 株と Pf の野生株との長期培養環境下における増殖の比較検討。



我々は過去の研究結果から、PfNCR1 は Pf の生存に必須である Chol の取り込みに関わっている可能性を得ていた。そこで今回、PfNCR1 の機能解析を目的として、PfNCR1 をノックダウンさせた Pf-cKD 株と野生株との増殖能を比較した。その結果、Pf-cKD 株のほうが増殖カーブの立ち上がりが遅く、また、アッセイ開始 Day12 の DNA 量は、Pf-cKD 株のほうが野生株より

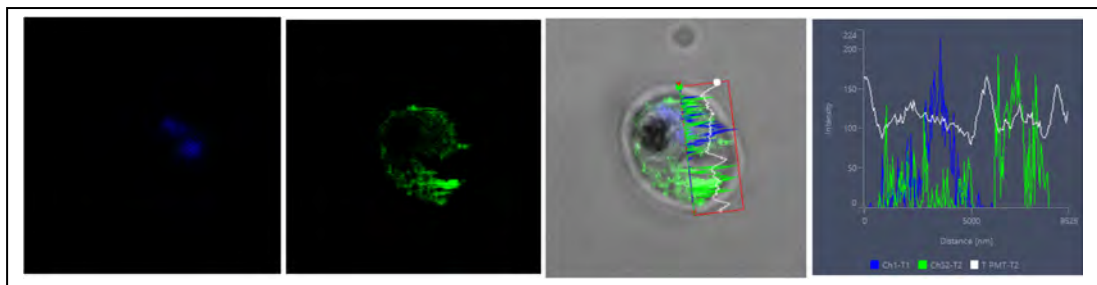
も低い結果となった。今回我々が行った長期培養期間でのアッセイは、健康な原虫を維持するために感染率を一定以下に保ちながら培養を行う必要性から、培養細胞の希釈を繰り返す。そのためテクニカルエラーが出やすいという問題点があり、本実験に対し再現性の高いデータを得るために、現在、同アッセイを繰り返し行っている。

- (2) Pf 野生株と cKD 株における感染赤血球内部の脂質、コレステリルエステルの局在分布の検討

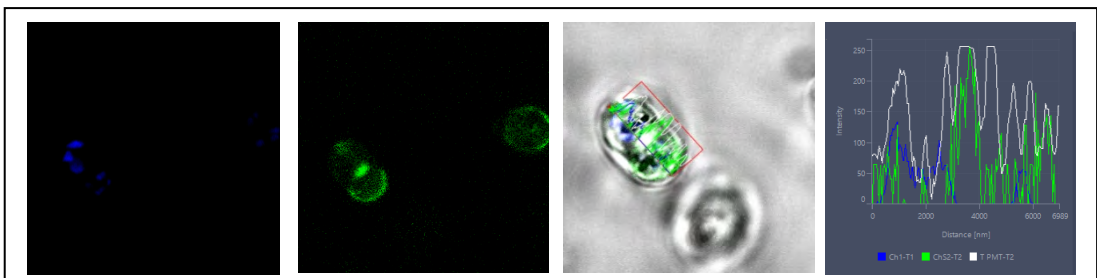
Chol は血液中のトータルコレステロールのうち、約 9 割がコレステリルエステルとして、約 1 割が遊離型 Chol の形態で存在する。また、HDL、LDL など各種リポタンパク質の構成因子の 1 つでもあるが、各種リポタンパク質におけるコレステリルエステル、遊離 Chol の比率は、リポタンパク質の種類によって大きく異なる。最近の我々の研究では、Pf は赤血球感染期において血液中のリポタンパク質から Chol を得たのち、Chol を含む赤血球の膜断片の一部が PVM(寄生胞膜)まで膜輸送され、最終的に原虫体内に取り込まれると考えられる。過去の我々の研究において、PfNCR1 を標的とした Chol 取り込み阻害剤を用

いた際の遊離型 Chol の局在分布については報告済みであるが(Hayakawa et al., 2020, *Scientific Report*)、コレステリルエステルの局在については未確認であった。そこで今回、コレステリルエステルの蛍光アナログである Bodipy-cholesteryl esters を用いて、野生株と KD を起こしていない遺伝子改変原虫(グルコサミン非添加)を用いて感染赤血球内のコレステリルエステルの分布を共焦点顕微鏡により観察を行った。結果として、野生株感染赤血球では、赤血球膜にコレステリルエステルの局在は認められなかったが、遺伝子改変原虫が感染した赤血球では赤血球膜、赤血球の細胞質の双方でコレステリルエステルの局在が確認された。さらに、過去の遊離型 Chol の局在分布と比較すると、遊離コレステロールは感染赤血球内の細胞質に蓄積するように高濃度で分布していたが、今回のコレステリルエステルは遊離型 Chol ほど高濃度での分布は確認できなかった。この結果から、リポタンパク質を供給源として取り込まれた遊離型/エステル型-Chol は、感染赤血球内に取り込まれた後、遊離型 Chol として膜輸送され、原虫に取り込まれている可能性が示唆された。

Pf野生株-感染赤血球



Pf-cKD 株-感染赤血球 (誘導前)

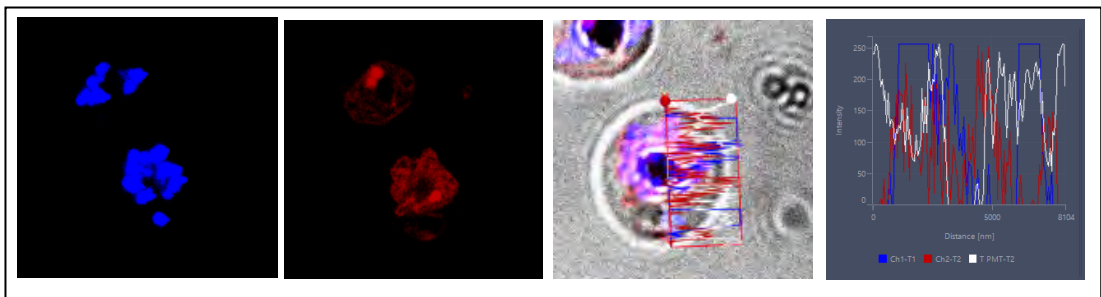


(3) Pf野生株-感染赤血球内における中性脂質の分布

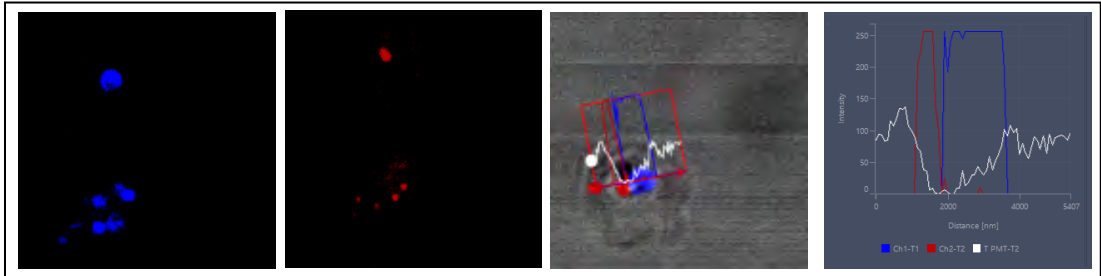
外部環境から取り込まれた Chol は、赤血球膜に取り込まれたあと、他の脂質分子と一緒に膜断片の一部として膜輸送され PVM まで輸送される。赤血球膜には主要脂質であるリン脂質のほか、中性脂質も存在し、特にトリアシルグリセロールやステロールエステルといった中性脂質は、細胞内で脂肪滴の主要構成因子として存在する。中性脂質は、小胞体においてリン脂質の生合成経路の一部として生成され、脂肪滴としてプールされるため、脂質代謝にも密接に関係している。こ

れらを踏まえ、脂肪滴の形成/局在と Chol 輸送との関係を検討するため、Chol 取り込み阻害剤存在下で脂肪滴の形成/局在について蛍光観察を行った。最初に、*Pf* 野生株-感染赤血球に対し Chol の取り込み阻害剤;ezetimibe (Hayakawa et al., 2021, *Parasitology International*) の有無について検討した。蛍光標識は中性脂質、脂肪滴を認識する Lipi-Deep Red を用いた。その結果、*Pf* 野生株-感染赤血球では Lipi-Deep Red の蛍光シグナルは感染赤血球の細胞質やメロゾイトの細胞膜に分布していた。これに対し ezetimibe 存在下では、ezetimibe なしと比べて、*Pf* の核周辺に蛍光シグナルが局在していた。

Pf 野生株-感染赤血球



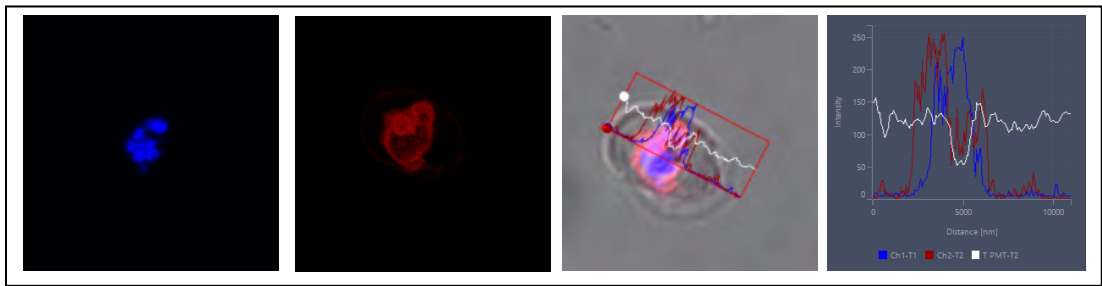
Pf-野生株-感染赤血球+ezetimibe



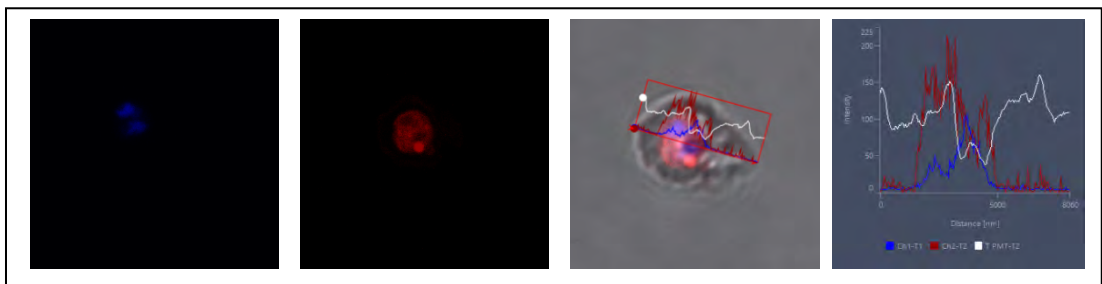
(4) *Pf*-cKD 株-感染赤血球 (誘導前、後) 内における中性脂質の分布

*Pf*NCR1 の cKD 株 (誘導なし)、およびグルコサミンによる cKD 誘導株に ezetimibe 処理したのち Lipi-Deep Red 染色し、中性脂質/脂肪滴の分布・局在について蛍光像観察を行った。cKD 誘導前の感染赤血球では、*Pf* の核周辺および PVM に Lipi-Deep Red の分布が確認された。cKD 誘導後の感染赤血球でも、赤血球膜や赤血球の細胞質では蛍光シグナルは確認されず、原注の核周辺と PVM でのみ確認された。また *Pf* の核近傍で脂肪滴も確認された。これらの結果は、Chol の取り込みに関係すると考えられる *Pf*NCR1 の cKD 誘導条件下と、ezetimibe 添加による Chol の取り込み阻害条件下では、中性脂質/脂肪滴の分布に対して、類似の細胞内局在を示すことがわかった。

Pf-cKD 株-感染赤血球 (誘導前) +ezetimibe



Pf-cKD 株-感染赤血球 (誘導後) +ezetimibe



③ 成果の公表

なし

6. 自己評価

Chol は熱帯熱マラリア原虫 (*Pf*) の生存、増殖に必要不可欠の分子でありながら、原虫自身には *de novo* の合成経路がないため、原虫は外部環境から取り込む必要がある。*Pf* は Chol (-) の培養条件下では増殖不可能なことから、原虫が Chol を取り込めない条件を見つけることができれば、新たな抗マラリア薬の開発につながる可能性が高い。これらを念頭に本年度は、*Pf* が持つ PfNCR1 タンパク質の機能解析として、CKD 株を作成し、PfNCR1 の基本的な性質について解析した。初年度の結果をもとに現在、次の段階である構造解析のために実験材料を作成中であり、初年度としては今後の研究につながる一定の成果をえられたと考えている。

7. 達成度

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

「6. 自己評価」に記載したので省略

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：トリパノゾーマ科原虫が持つ変異型オートファジー関連因子 ATG12 結合系の機能解析と生理学的意義の解明

課題番号：2022-Ippan-14

2. 代表者：（千葉大学大学院医学研究院・特任助教）坂本寛和

共同研究者：（長崎大学熱研・准教授）稲岡健ダニエル

（千葉大学大学院医学研究院・准教授）彦坂健児

（千葉大学大学院医学研究院・博士課程学生）林 暁霞

（長崎大学熱研・助教）佐倉孝哉

3. 決定額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

オートファジーは、真核生物細胞が普遍的に持つ細胞内の大規模分解系であり、細胞外ストレス時（特に飢餓）における細胞の恒常性維持に欠かせない。これは、オートファジー関連 ATG 因子が協調的に機能する事で実行され、特にユビキチン様 ATG12 結合系（図 1A）により形成される **ATG12-ATG5 共有結合体の E3 様酵素活性は ATG8 のオートファゴソーム膜への局在化に必須**であり、真核生物に普遍的に保存されている。ところが、申請者らはアピコンプレクサ門寄生原虫（マラリア原虫など）では、ATG12 と ATG5 がユビキチン様の共有結合反応をせずとも非共有結合で複合体を形成する事、および本来の E3 様酵素活性を持つ事を実験的に証明した（**図 1B**；**研究業績 6**）。さらに、ATG12 結合系についてより広範な真核生物を対象に注意深く調べると、シャーガス病やアフリカ睡眠病の病原体であるトリパノゾーマ科寄生原虫の ATG12 結合系では肝心の ATG12 が欠損している事を見出した（**図 1C**；**研究業績 2**）。これらの原虫では、寄生環境の変化に伴う原虫のステージ転換時に ATG8 が膜に局在化する。これは、ATG12 結合系による ATG8 への E3 様活性がある事を示すが、ATG12 が欠損しているため、その分子機構が不明である。そこで本研究では、トリパノゾーマ科原虫の ATG8 の脂質化に対する E3 様酵素の実態を解明する事を目的とし、

ATG12 代替分子の同定と、典型的な ATG12 との立体構造比較解析による

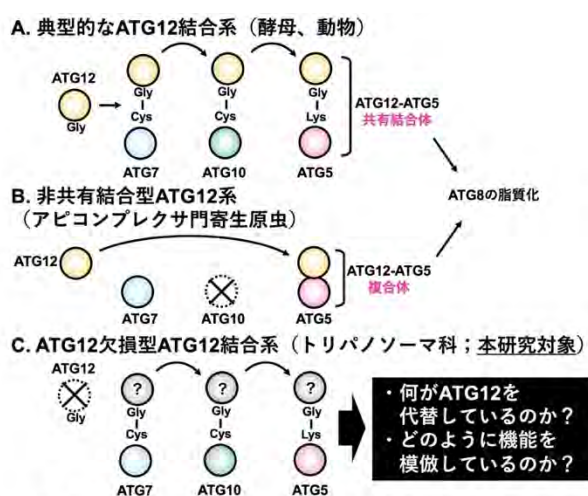


図1. ATG12結合系の様式には多様性がある

ATG12-ATG5 の E3 様酵素活性の作動原理の普遍性の解明を目指す。

② 研究内容

本研究は、トリパノソーマ科原虫の ATG12 代替分子の同定を初めに検証する。**ATG12 と最も相同性の高いユビキチン様タンパク質である ATG8 を第一候補として検証する。**重要な事に、酵母やアピコンプレクサでは単一コピーである ATG8 が、トリパノソーマ科原虫では多コピーであるため、これらのいずれかが ATG12 として機能している可能性がある。ユビキチン様結合反応は容易に *in vitro* 再構成系が構築できるため、トリパノソーマの ATG 因子群の組換えタンパク質を個別で合成・精製し、それらを用いた「ユビキチン結合試験」および「ATG8 脂質化試験」を *in vitro* で実施し、いずれかの ATG8 が ATG5 と結合するか、また、それが ATG12-ATG5 の本来の機能である ATG8 の脂質化を触媒する E3 様活性を持つかをそれぞれ検証する (図 2)。もし ATG8 が ATG12 の代替分子でなかった場合、エピトープタグ融合 ATG5 をトリパノソーマに強制発現させ、その細胞抽出液を用いた共免疫沈降によって結合相手を同定する計画である。

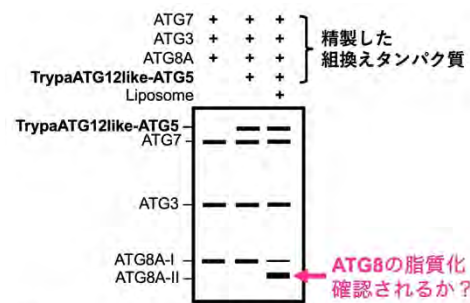


図2. *in vitro*再構成系ATG8脂質化試験のイメージ

次年度以降は、ATG12 代替分子と ATG5 結合体の立体構造解析に着手し、ATG12 代替分子がどのように ATG12 の機能を模倣しているかを解析し、典型的 ATG12 との比較から ATG12 として機能するために不可欠な特徴を明らかにする (図 3)。また、同定された ATG12 代替分子のコンディショナル遺伝子破壊原虫を作成し、ATG8 の局在化への影響とそれがステージ転換や生存に及ぼす影響を検証する。

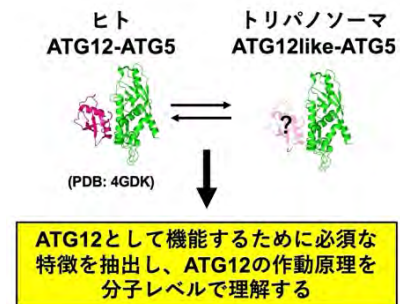


図3. 立体構造比較による ATG12の作動原理の理解

③ 予想される成果

ユビキチン/ユビキチン様タンパク質を共有結合によりそれらの基質タンパク質と結合させる「ユビキチン様共有結合反応」は、真核生物に普遍的に保存されており、様々な細胞機能を担う重要なシステムである。我々は細胞の恒常性の維持に重要であるオートファジーに必須なユビキチン様タンパク質の1つである ATG12 結合系には多様性がある事を寄生性原虫から見出した。本研究では、これらの多様な形態から形成される ATG12 がいかにしてその本来の酵素活性を維持しているかを明らかにする。本研究からは、ATG12 の作動機序についてモデル生物からは得られない新規かつ本質的な情報が得られる事が期待される。また、ATG12 のみならず、ユビキチン様共有結合系そのものにも新たな洞察をもたらし、これらの普遍的な作動原理や進化的起源の理解が深まる事が期待される。さらに、トリパノソーマ科原虫オート

ファジーの独特な分子機構の理解は、選択性の高い治療薬となる可能性も秘めており、本研究で解明する **ATG12** の多様性の解析は、その基盤情報を提供する。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

ATG8 と ATG12 は共にユビキチン様タンパク質であり、ユビキチンフォールド構造をもつ。これらのアミノ酸配列の相同性は高く、ATG12 は ATG8 から進化したことが示唆されている（Zhang, Yazaki, Sakamoto et al. *Autophagy*, 2022）。これまで、*T. cruzi*, *T. brucei* では、ATG12 が見つからないが ATG8 が多コピー同定されていたため、本研究では、いずれかの ATG8 が ATG12 として機能しているという仮説を立てた。実際に、全ての真核生物スーパーグループをカバーする約 100 種の ATG8 と ATG12 配列を用いた配列類似性解析を行なった結果、これまで ATG8 とアノテートされていた *T. brucei* ATG8.3 が ATG12 にクラスタリングされることを研究代表者らは 2022 年に報告した（Zhang, Yazaki, Sakamoto et al. *Autophagy*, 2022）。この結果は、我々の「ATG8 とアノテートされた因子が実は ATG12 として機能している」という本研究の仮説を強く支持する。

令和4年度は、未だ ATG12 が同定されていない *T. cruzi* に対象を絞って多コピー ATG8 の性状解析を実施した。*T. cruzi* には、ATG8 とアノテートされた因子が3つあり（TcATG8.1, TcATG8.2A, TcATG8.2B）、アミノ酸配列および二次構造を比較すると、TcATG8.1 は典型的 ATG8 の特徴をもつ一方で、TcATG8.2A/B は ATG8 のコア構造をもつものの、N 末端側に長い伸長配列がある特殊な構造をしている（図4）。さらに、飢餓によってオートファジーを誘導した *T. cruzi* 細胞において、TcATG8.1 は典型的なドット状局在を示すのに対して、TcATG8.2A/B はそれを示さないことも知られている（Sakamoto et al. *Cells*, 2021）。以上のことから、TcATG8.2A/B は、飢餓誘導時のオートファジーに関与しないか、そもそも ATG8 として機能していない可能性が考える。本研究では、TcATG8.2A/B が ATG12 として機能するであろうと考え、その性状を解析した。まず、典型的な ATG8 として機能しうる可能性を排除するために、ATG8 の E2 様酵素である ATG3 との結合能力を検証した。次に、典型的な ATG12 の特徴である ATG5 との結合能力を検証した。

上記の検証のため、まず、6種の *T. cruzi* ATG タンパク質（ATG3, ATG5, ATG7, ATG8.1, ATG8.2A, ATG10）をコードする遺伝子をエピトープタグを保持するプラスミドへクローニングした。なお、鑄型とした *T. cruzi* のゲノム DNA は、長崎大学熱帯病研究所・稲岡研究室から提供して頂いた。得られたプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションして組換えタンパク質を発現させ、全ての TcATG タンパク質の発現をエピトープタグ抗体を用いたウェスタンブロットにより確認したのち、タンパク質精製のための安定発現 HEK293T 細胞の作出を行なった。申請当初は、精製した TcATG タンパク質を用いた *in vitro* 系で試験する予定であったが、全6種類の ATG タンパク質を安定発現する HEK293T 細胞株の樹立および、全6種類の精製タンパク質を揃えることが難航したため、*in vitro* 解析から、HEK293T 細胞内に複数の TcATG を共発現系させてそれらの挙動を解析する手法に切り替えた。

② 成果（結果+考察）

TcATG8.2A/B は独特な構造をもつ

上記の3つの TcATG8 (TcATG8.1, TcATG8.2A, TcATG8.2B) の構造的な違いを検証するため、AphaFold2 によって予測された立体構造を比較した (図 4)。その結果、これら3つの間で ATG8 コア領域の二次構造はほぼ完全に一致したが、ATG8 が PE (ホスファチジルエタノールアミン) と共有結合するため、C 末端グリシン残基の向きが、TcATG8.1 と TcATG8.2A/B で異なる方向を向いていた。これは、TcATG8.1 と TcATG8.2A/B の間で結合相手が異なる可能性を示唆する。

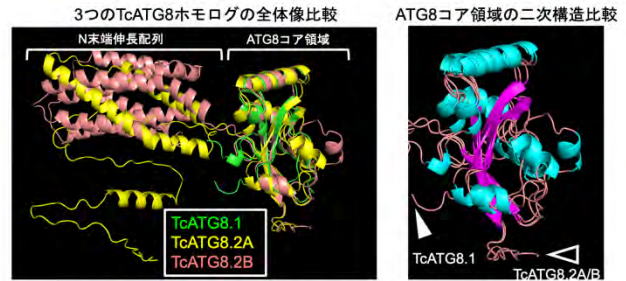


図4. *T. cruzi* の3つのATG8ホモログの立体構造比較

TcATG8.2A は典型的な ATG8 ではない

ATG8 は、通常時は細胞質に分布するが、飢餓などによるオートファジー誘導時には細胞膜 (特にオートファゴソーム) 上の PE (ホスファチジルエタノールアミン) と結合することでドット状に観察される。*T. cruzi* でも、飢餓によるオートファジー誘導時に TcATG8.1 はドット状局在を示し、PE と結合して ATG8 として機能することが示されている。一方で TcATG8.2A/B はドット状局在を示さず、ATG8 として機能していない可能性がある。ATG8 がドット状に局在するには、ATG7 と ATG3 によるユビキチン様反応が必要である (図 5)。そこで、TcATG8.1 と TcATG8.2A の TcATG3 との結合能力を検証した。なお、TcATG8.2A は、全長配列では発現量が低かったため、N 末端の伸長配列を除去した ATG8 コア領域のみを発現させて検討した。

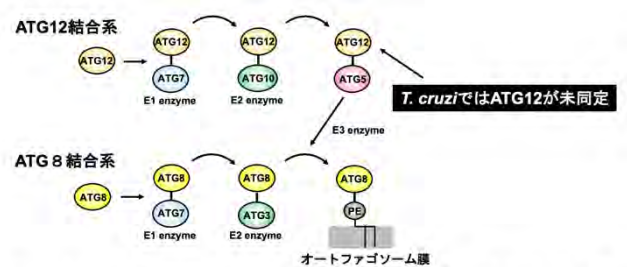


図5. オートファジーに必須な2つのユビキチン様結合反応系

典型的な ATG8 局在を示す TcATG8.1 は、TcATG3 との結合 (チオエテル結合) が検出された (図 6A) が、TcATG8.2A はそれが検出されなかった (図 6B)。この結果は、TcATG8.1 は TcATG7 と TcATG3 を介したユビキチン様反応で PE と結合することを示しており、飢餓状態のドット状局在の知見と一致する。また、TcATG8.2A と TcATG3 の結合は確認されず、これも飢餓状態でドット状局在を示さない知見と一致した。すなわち、これらの ATG8 ホモログの TcATG3 との結合能による違いが飢餓時における局在の違いであることが示された。さらに、TcATG8.2A/B が TcATG3 と結合する能力をもたないことから、もはや ATG8 として機能できない可能性が示唆された。

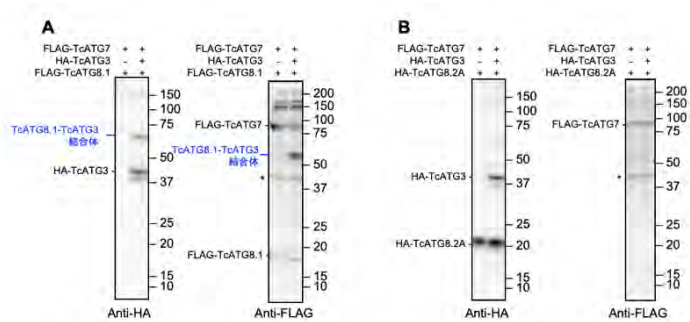


図6. TcATG8ホモログのATG3結合能力の評価

HEK293T細胞に各TcATGを共発現させて、TcATG3とTcATG8.1 (A) およびTcATG8.2A (B) の結合能力を評価した。FLAG抗体検出メンブレン中の約40kDaのシグナル (*) は非特異的シグナル。

TcATG8.2A と ATG5 の結合は検出されなかった

ATG12はユビキチン様反応によってATG5と共有結合を形成する(図5)。したがって、もしTcATG8.2AがATG5と共有結合を形成すればATG12として機能する可能性が強く示唆される。そこで、ATG12共有結合系に關与するTcATGタンパク質群をHEK293T細胞で共発現させた。しかし、TcATG8.2AとTcATG5の共有結合体は検出されなかった(図7)。

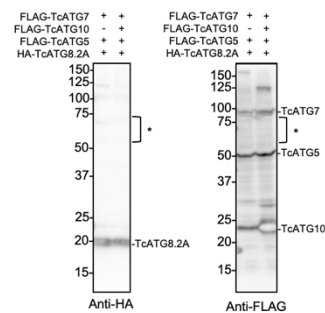


図7. TcATG8.2AとTcATG5の共有結合形成の検討

HEK293T細胞に各TcATGを共発現させて、TcATG8.2AとTcATG5の共有結合形成を評価した。共有結合体の予測サイズ(*)付近にシグナルは検出されなかった。

本検証には、全長TcATG8.2Aを用いた追試が必要であると考えている。典型的なATG12は、N末端に伸長配列をもち、これがATG5との共有結合体の安定性に寄与している。したがって、TcATG8.2もそのN末端伸長配列がATG5との共有結合の形成に寄与している可能性がある。実際に、トキソプラズマATG12では、その伸長配列を除去するとATG5との共有結合体の形成量が低下した(Pan, Yamamoto, Sakamoto et al. Nat Struct Mol Biol, 2019)。TcATG8.2におけるN末端伸長配列の検証に課題が残された。

- ③ 成果の公表
該当事項なし

6. 自己評価

*Trypanosoma cruzi*における ATG12 の代替因子の同定を目指した本研究では、多コピー存在する TcATG8 (TcATG8.1, TcATG8.2A, TcATG8.2B)のいずれかが ATG12 として機能するという仮説を立てた。これまで、これらの TcATG8 の局在のみが解析されており、その分子機構については報告がなかった。本研究では、これらの局在の違いが TcATG3 との結合能力に依存していることを明らかにできた。TcATG8.2A は TcATG3 との結合能力がないことから、もはや ATG8 として機能できないことが示唆された。すなわち、本研究における「ATG8 が ATG12 に機能進化した」とする仮説を支持する成果を得た。しかしながら、TcATG8.2A が ATG12 として機能する直接的なデータを得るには至らなかった。まとめると、ATG12 の代替因子を同定する当初の目標は達成されなかったが、TcATG8.2A がもはや ATG8 として機能しないことを示唆する知見が得られ、*T. cruzi*におけるオートファジー分子機構の解明につながる萌芽的な成果を挙げることができた。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由 (「6. 自己評価」で述べてあれば省略可)

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：熱帯熱マラリア原虫ガメトサイト期における原虫タンパク質
輸送機構の解析

課 題 番 号：2022-Ippan-15

2. 代 表 者：入子 英幸（神戸大学大学院 保健学研究科・准教授）

共 同 研 究 者：面田 彩馨（神戸大学大学院 保健学研究科 博士後期課程）

宮崎 真也（長崎大学熱帯医学研究所 細胞環境構築学分野・助教）

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究の目的は、熱帯熱マラリア原虫のトランスロコン複合体と関連する寄生胞膜分子のガメトサイト形成、原虫タンパク質輸送における役割を明らかにすることである。本研究では、ガメトサイト期の感染赤血球表面に発現する原虫タンパク質を同定する。次に、トランスロコン複合体関連分子群の遺伝子改変原虫を作出し、遺伝子改変による感染赤血球表面に輸送される原虫タンパク質の挙動を調べ、ガメトサイト期の原虫タンパク質輸送に関与する分子を同定する。

② 研究内容

1. ガメトサイト期の感染赤血球表面に発現する原虫タンパク質の同定

熱帯熱マラリア原虫ガメトサイト期の感染赤血球表面をビオチン標識し、ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いて回収し、質量分析により感染赤血球表面に発現する原虫タンパク質を同定する。

2. 新規ガメトサイト期トランスロコン関連分子の遺伝子改変原虫の作出

申請者らが見出したガメトサイト期に発現する ETRAMP ファミリー分子（ETRAMP4, 10.2, 10.3）、PTEX 複合体の構成タンパク質（EXP2, HSP101, PTEX150）の遺伝子改変を行う。

3. 新規ガメトサイト期トランスロコン関連分子の表現型解析

作出した遺伝子改変株を用いて、赤血球内での増殖やガメトサイト形成能、ガメトサイト期感染赤血球表面への原虫タンパク質の輸送に与える影響を調べる。

③ 予想される成果

本研究により、熱帯熱マラリア原虫ガメトサイト期において、これまでに機能が不明であった ETRAMP ファミリー（ETRAMP4, 10.2, 10.3）および PTEX 複合体構成タンパク質（EXP2, HSP101, PTEX150）のガメトサイト形成、原虫タンパク質輸送における役割が明らかになることが期待される。従来の研究では、ガメトサイト形成の際に

どのような病原性タンパク質が赤血球へと輸送されるかは示唆されていたが、その輸送を担う原虫側の輸送マシーナリーの実体は不明であった。本研究により、ガメトサイト期の原虫タンパク質輸送に関与する分子が明らかになると考えられる。本研究を遂行することにより、マラリア原虫のガメトサイト期の生物学の理解が深まり、さらにヒトから蚊への感染を阻害する新たな抗ガメトサイト薬開発の基盤構築にもつながっていく。

5. 実施報告

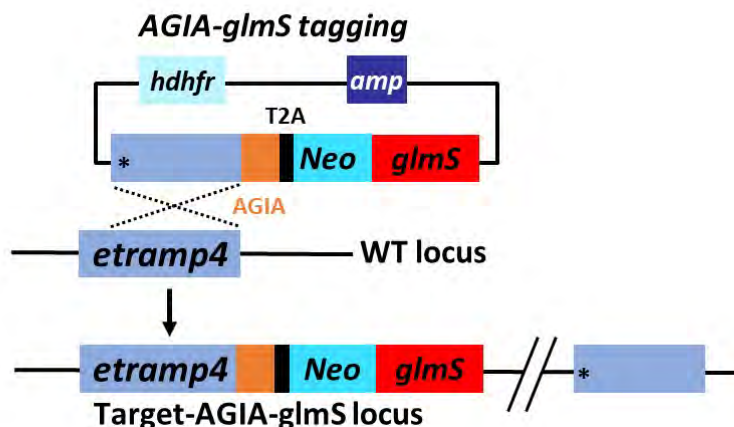
① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

1. ガメトサイト期の感染赤血球表面に発現する原虫タンパク質の同定

熱帯熱マラリア原虫 NF54 株の生殖母体を培養した。培養条件は、ヘマトクリット 2%、混合ガス（N₂:90%、CO₂:5%、O₂:5%）、N-アセチルグルコサミン添加とし、11 日間培養を行った。生殖母体の発育状況は、塗抹標本のギムザ染色像により確認した。生殖母体感染赤血球は、パーコール密度勾配遠心法を用いて精製した。感染赤血球の表層は、ビオチン標識試薬（Biotin-SS-Sulfo-OSu）を用いて標識した。ビオチン化標識タンパク質は、ストレプトアビジン結合磁気ビーズ（C1: カルボキシル基活性化ビーズ、T1: トシル基活性化ビーズ）により回収し、SDS-PAGE（還元条件）で展開後、銀染色を行った。溶出画分に観察されたゲル断片は、脱色、システイン残基の還元処理及びアルキル化、トリプシンによるゲル内消化を行った後、消化されたペプチド断片を抽出し、脱塩処理の後、nanoLC-MS/MS で質量を測定した。

2. 新規ガメトサイト期トランスロコン関連分子の遺伝子改変原虫の作出

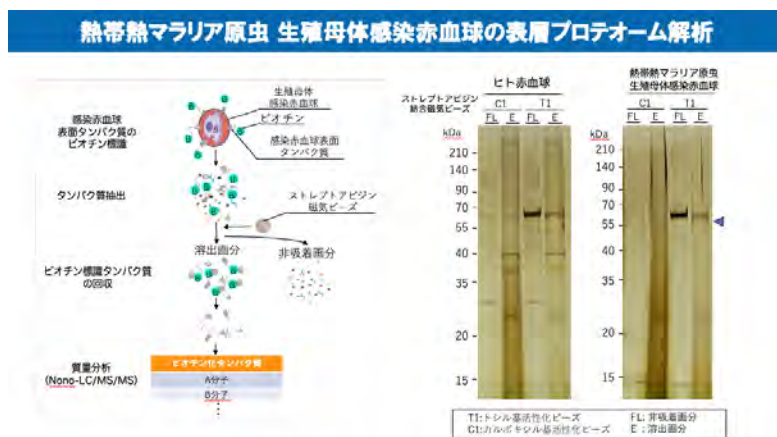
熱帯熱マラリア原虫の ETRAMP4 遺伝子を標的として、遺伝子改変ノックダウン原虫の作出を試みた。先行研究で使用実績がある glmS ノックダウン用プラスミドの中に標的遺伝子である ETRAMP4 遺伝子の相同領域を組み込んだプラスミドをクローニングした。クローニングしたプラスミドをマキシプレップで大量調製し、熱帯熱マラリア原虫 NF54 株へとトランスフェクションした。



② 成果（結果＋考察）

1. ガメトサイト期の感染赤血球表面に発現する原虫タンパク質の同定

ヒト赤血球および生殖母体感染赤血球の表層タンパク質をビオチン標識し、2種類のストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いて回収して、SDS-PAGEで展開後、銀染色を行なった。銀染色像を観察したところ、生殖母体感染赤血球に特異的なバンドが確認された。これらのバンドを含むゲル断片を切り出し、ペプチドマスフィンガープリンティングを試みたが、有意なタンパク質を同定することができなかった。本実験では、リンカー部位にジスルフィド基が導入されたビオチン標識試薬を用いて、標識タンパク質をストレプトアビジン結合磁気ビーズへ捕捉後、還元操作によるリンカー部位の切断による回収するという手法を選択した。本実験の結果から、①ビオチン標識のリンカー部分の切断が不十分であること、②ストレプトアビジンとビオチンとの強力な結合のため磁気ビーズから溶出されていない、などの可能性が示唆された。現在、アビジン様タンパク質であるタマビジンの結合磁気ビーズを用いた回収法を検討中している。



2. 新規ガメトサイト期トランスロコン関連分子の遺伝子改変原虫の作出

熱帯熱マラリア原虫の ETRAMP4 ノックダウン用プラスミドをトランスフェクションした後に、WR99210 を使いプラスミドを保持する原虫を薬剤選択した。WR99210 で選択した原虫は培地中で効率よく増殖したため、最初の薬剤選択は順調に進展したと考えられた。その後、プラスミドがゲノムに組み込まれた原虫を選択するために、G418 で薬剤選択を行い、続き WR99210 と G418 の二重選択を行った。この二重選択下でも原虫は順調に増殖したためゲノム DNA を抽出し、プラスミドの挿入を確認するための PCR を行った。しかし、目的のプラスミドのゲノムへの挿入は確認されなかった。これらの結果から薬剤選択のプロセスに何らかの問題があることが判明した。様々な薬剤選択条件を比較する検討により、現在使用している WR99210 のロットに問題があることが示唆されたため、現在別ロットの WR99210 を使用した二重選択による遺伝子改変原虫の再作出を検討している。

③ 成果の公表

該当なし

6. 自己評価

本研究課題では、まず最初に、熱帯熱マラリア原虫のガメトサイト期の感染赤血球表面に発現する原虫タンパク質の同定を目指し研究を開始した。一連の実験により、生殖母体感染赤血球の調製、感染赤血球表層タンパク質のビオチン標識、質量分析の実験条件を検討し、今後の課題を明確にすることができた。トランスロコン関連分子の遺伝子改変原虫の作出については、薬剤選択プロセスを改善することで当初の目的が達成できると考えられた。今後は、本研究課題により得られた基礎情報をもとに、感染赤血球表層プロテオーム解析およびトランスロコン関連分子の機能解析を進めていきたいと考えている。

7. 達成度

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：新規バベシア原虫赤血球修飾分子 BbDnaK の局在・機能解析
課 題 番 号：2022-Ippan-17
2. 代 表 者：麻田正仁(帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授)
共 同 研 究 者：坂口美亜子(長崎大学・熱帯医学研究所・助教)
渡邊勇歩(帯広畜産大学・原虫病研究センター・特任研究員)
3. 決 定 額：350 千円

4. 研究計画

① 研究目的

脳性バベシアの分子機序を明らかにするため、申請者らが見出した新規赤血球改変分子 BbDnaK の局在及び機能解析を行う。これまでに Myc タグ標識した BbDnaK 過発現バベシア原虫が作製されており、間接蛍光抗体法により、BbDnaK が原虫細胞質のみならず感染赤血球内にも局在することが明らかになっている。本研究では免疫電子顕微鏡法にて詳細な BbDnaK の局在解析を行う。さらに BbDnaK 遺伝子のノックアウト及び、ノックダウンを行うことにより、VESA-1 の局在や血管内皮細胞接着性などのような影響が出るか解析を行う。

② 研究内容

・BbDnaK の局在解析（免疫電子顕微鏡担当：坂口、観察時に渡邊、麻田が長崎訪問）
感染赤血球内並びに原虫内における BbDnaK の詳細な局在解析を免疫電子顕微鏡法により行う。赤血球内では赤血球膜近傍や細胞質における局在、原虫内においてはスフェリカルボディ（VESA-1, VEAP など既知赤血球修飾分子が局在する細胞小器官）における局在があるか解析を行う。また、VESA-1 に対する特異抗体を作製し、VESA-1 と BbDnaK の共局在を解析する。免疫電子顕微鏡観察時に渡邊、麻田が長崎を訪問し、共に観察を行う。

・BbDnaK の機能解析（免疫電子顕微鏡担当：坂口、それ以外の担当：渡邊、麻田）
免疫沈降法とその後のウェスタンブロッティングにより BbDnaK と VESA-1 が相互作用する分子であることを確認する。また、CRISPR/Cas9 システムによる BbDnaK 遺伝子のノックアウト(KO)を試みる。遺伝子の KO により原虫が得られなかった場合は glmS リボザイム法により遺伝子のノックダウン(KD)を行う。KO ないし KD 原虫について間接蛍光抗体法並びに免疫電子顕微鏡法により VESA-1 の発現・局在への影響を解析する。また、感染赤血球を用いたウシ脳毛細血管内皮細胞への接着試験を実施し、接着性への影響を評価する。得られた結果についてはマラリア原虫における知見との比較考察を行う。

③ 予想される成果

BbDnaK は VESA-1 を用いた免疫沈降により同定された分子であり、感染赤血球内に局在するため、VESA-1 の感染赤血球表面への輸送に関わる分子であることが予想される。本研究により BbDnaK が VESA-1 の輸送に重要な役割を果たす分子であることが示されれば、脳性バベシアの分子機序の一端が明らかになり、治療標的分子となることが考えられる。また、これまでマラリア原虫、バベシア原虫で発見された赤血球修飾分子間において配列上の相同性は見出されていない。そこで、両原虫を比較することにより、各々の原虫がどのように赤血球改変機構を獲得してきたのか考察することが可能となる。

5. 実施報告

① 令和 4（2022）年度実施計画に対する実施状況

計画に従い *Babesia bovis* BbDnaK の局在・機能解析を実施した。局在解析では Myc タグ配列を付加した BbDnaK 発現原虫を作製し、BbDnaK の局在を解析した。また、より詳細な局在解析を行うため、免疫電子顕微鏡法による観察も行った。さらに、オルガネラ局在の解析を進めるために、スフェリカルボディタンパク質に対するペプチド抗体を作製した。BbDnaK の機能解析では、まず CRISPR/Cas9 システムを用いた BbDnaK 遺伝子のノックアウトを試みたが、目的とする原虫が得られなかったため、glmS リボザイム配列を用いた BbDnaK ノックダウン原虫を作製した。

② 成果（結果＋考察）

・ BbDnaK の局在解析

Myc タグを付加した BbDnaK を発現する *B. bovis* を作製し、抗 Myc タグ抗体を使用した間接蛍光抗体法を行った。顕微鏡による観察を行った結果、原虫細胞質に強い蛍光が見られるとともに、原虫感染赤血球内にも蛍光が観察された（図 1A）。また、単梨子型虫体の寄生する感染赤血球の方が比較的赤血球内での蛍光シグナルが強く、ドット状の蛍光が観察された（図 1B）。更なる解析が必要であるが、メロゾイトが赤血球侵入後早い段階で BbDnaK を放出し、赤血球側に輸送されていることが示唆された。さらに BbDnaK の詳細な局在を観察するため、同原虫を免疫電子顕微鏡観察に供した。電子顕微鏡観察からは細胞質に一樣に金粒子の局在が見られ、これまで多くのバベシア由来感染赤血球修飾分子において知られているスフェリカルボディ局在ではないことが示唆された（図 1C）。また、感染赤血球については特異的な金粒子の局在は観察されなかった。さらに、電子顕微鏡観察に並行して抗スフェリカルボディ抗体として、BbSBP3 に対するペプチド抗体を作製した。免疫電子顕微鏡法の結果から BbDnaK はスフェリカルボディに局在しない可能性が高いが、今後共染色や後述の BbDnaK ノックダウン原虫の機能解析に使用する予定である。

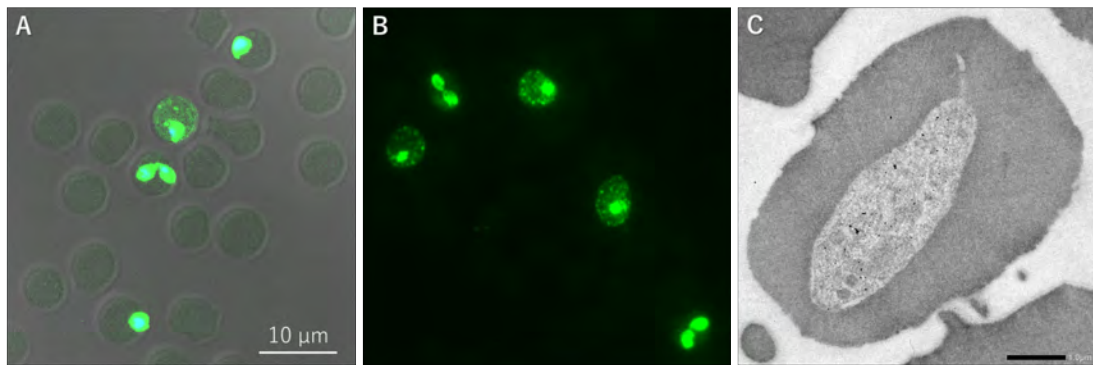


図1. BbDnaKの局在解析。A: 共焦点顕微鏡による重ね合わせ像(緑:BbDnaK, 青:核染色)。B: 蛍光顕微鏡像。単梨子原虫感染赤血球において赤血球側に比較的強い蛍光が観察される。C: 免疫電子顕微鏡像。特定のオルガネラではなく、原虫細胞質に比較的一様に金粒子が観察される。

・ BbDnaK の機能解析

代表者らが確立した CRISPR/Cas9 システムを用い、BbDnaK 遺伝子のノックアウトを試みた。2 種類のガイド RNA について、遺伝子ノックアウトプラスミドを構築し、トランスフェクションを行い、WR99210 にて選択を行った。しかしながら、目的とする原虫は現れず、BbDnaK 遺伝子がバベシア原虫の生存に必須である可能性が考えられた。そこで、次に glmS を使用した遺伝子ノックダウン原虫の作製を行った。BbDnaK 遺伝子の 3' 側に Myc タグ配列と glmS 配列を挿入するプラスミドを作製し、トランスフェクションを行った。WR99210 による薬剤選択により、薬剤耐性原虫が得られ、原虫から抽出した DNA を用いた PCR により、目的とした組換えが確認された。現在得られた組換え原虫のクローニングを行っており、機能解析に進む予定である。

③ 成果の公表

学会発表

1. Hassan Hakimi, Thomas J Templeton, Miako Sakaguchi, Junya Yamagishi, Shinya Miyazaki, Kazuhide Yahata, Takayuki Uchihashi, Shin-Ichiro Kawazu, Osamu Kaneko, Masahito Asada. *Babesia* exported proteins that modify properties of infected red blood cells. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. March 2023, Manila, Philippines

6. 自己評価

実験の中心を担っていた渡邊博士が異動し、バベシアに関する実験を行えなくなったため実験が遅延し、予定していた実験を完了することができなかつた点は残念である。一方で、本共同研究の中心である免疫電子顕微鏡による観察を行う事ができ、BbDnaK 遺伝子ノックダウン原虫が得られ、ペプチド抗体も作製され、今後の解析に向けた重要な材料が得られたことは貴重な進展となった。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）

II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

2022 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : Pathogenomic and functional analysis to unravel the pathogenic potential of epidemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* from environmental sources

Project number : 2022 – Ippan – 18

2 . Principal investigator : Dr Krishna Kumar Ballamoole
Associate Professor
Division of Infectious Diseases
Nitte University Centre for Science Education & Research, Nitte (Deemed to be University), Paneer Campus, Deralakatte, Mangaluru-575018, India

Joint researcher(s) : Prof Dr Toshio Kodama
Department of Bacteriology
Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University,
Nagasaki, 853 8523, Japan

3 . Amount decided : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

- how environmental *V. parahaemolyticus* can emerge with the potential to cause human infection,
- what are the genetic traits and molecular strategies that contribute to the infection capability and fitness to host,
- what are strategies in these environmental isolates for virulence regulation and dispersal?

(2) Research content

The research interest of the Department of Bacteriology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, headed by Prof Toshio Kodama, focuses on the pathogenesis of enteric bacterial pathogens, including *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Salmonella enterica* spp. which is perfectly aligns with the research work proposed by Dr Kumar. Prof Kodama have worked on *V. parahaemolyticus* for decades and found that one set of Type III Secretion

System (T3SS2) is necessary for induction of diarrhoea in the patients infected with this pathogen. They have also identified and characterized effector proteins secreted from T3SS2 and revealed regulatory mechanisms of T3SS2-related genes. The laboratory of Prof Kodama recently demonstrated that an exotoxin, thermostable direct hemolysin (TDH), is secreted via T3SS2 in tandem with the Sec machinery, facilitating the distinct virulence traits. However, detailed mechanisms of how this pathogen colonizes the host intestine and induces diarrhea have remained unknown. We, therefore, try to understand a comprehensive mechanism of *V. parahaemolyticus* infection by generating a new murine infection model, dissecting the expression mechanism of T3SS2-related genes, determining biological activities of T3SS2 effectors, analyzing the interaction of microbiota, and other multidimensional approaches. The research proposed in this application will be a collaborative effort to uncover the pathogenic potential of *V. parahaemolyticus* isolated from the environment using a combination of techniques such as genomic characterization, biochemical functional studies and *in vivo* study using mutant strains to shed light on genetic characteristics factor(s) that contributes to global dissemination and to characterize its role in infection.

(3) Expected results

Pathogenicity islands, virulence-associated genes, and other genomic regions identified through this study would yield further insight into the ability of *V. parahaemolyticus* isolates to transition from an environmental niche and to emerge as highly virulent human pathogens. Further overall findings obtained through the proposed research would assist risk managers in designing and implementing food safety plans to minimize the risk associated with *V. parahaemolyticus* due to the consumption of seafood. The work proposed in this study will be our efforts towards SDG 3.3, which focuses on ending of infectious diseases affecting public health around the globe.

5 . Implementation report :

(1) Circumstances of Implementation against the FY2022 Implementation Plan

Dr Kumar along with his collaborator Dr Kodama has initiated the collection of 105 *V. parahaemolyticus* isolated from coastal environments in Southern India and identified using standard bacteriological methods. The collected isolates were characterized in detail for their virulence potential using molecular methods, in vitro cytotoxicity assay and expression of selected virulence. The selected pathotypes were further subjected to whole genome sequencing and the comparative analysis of sequence data is under process, expected to be completed in next 8 to 10 months. In order to progress the continue this interesting research further, we have applied for the 2023 General joint research from NEKKEN, unfortunately it was not selected.

(2) Results (results & observations)

A total of 105 *V. parahaemolyticus* isolated from coastal environments in Southern India and identified using standard bacteriological methods described were used in this experiment. Each isolate was inoculated to 5 mL of Luria-Bertani (LB) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) broth supplemented with 3% NaCl and incubated at 37 °C overnight with shaking.

When environmental isolates from this study were tested for the presence of classical virulence markers, one isolate (1%) tested positive for *tdh*, nine isolates (8.57%) tested positive for *trh*, and five isolates (4.76%) tested positive for both *tdh* and *trh* genes (Table 1A). Further PCR with pathogenicity island specific primers could determine the presence of pathogenicity islands and secretion systems in the environmental *V. parahaemolyticus* isolates. The genes of pathogenicity islands and secretion systems were detected in majority of the isolates (Table 1B), with VPaI-1 being found in 62 (59.04%), VPaI-4 in 63 (60%), and VPaI-5 in 36 (34.28%) isolates. While VPaI-2, 3, and 6 genes were found in 104 (99.04%), 96 (91.42%), and 104 (99.04%) isolates respectively.

Table 1. (A) Details of distribution of species specific and classical virulence genes *tdh* and *trh* in environmental *V. parahaemolyticus* isolates (n = 105). (B) Details of other virulence and fitness genes screened in environmental *V. parahaemolyticus* isolates (n = 105).

(A)										
Genes	<i>toxRVP tlh</i>		<i>tdh⁺ trh⁻</i>	<i>trh⁺ tdh⁻</i>	<i>tdh⁺ trh⁺</i>	<i>tdh⁻ trh⁻</i>				
No. of isolates positive	105		1	9	5	90				
% of isolates positive	100		0.95	8.57	4.76	85.71				
(B)										
Gene	T3SS1	T6SS 1	T6SS 2	VPaI 1	VPaI 2	VPaI 3	VPaI 4	VPaI 5	VPaI 6	VPaI 7/T3SS2
Number of isolates positive	103	64	104	62	104	96	63	36	104	36
% of isolates positive	98.09	60.95	99.04	59.04	99.04	91.42	60	34.28	99.04	34.28

In 36 (34.28%) isolates, a *tdh* and/or *trh* containing VPaI 7, which also encodes T3SS2, was partially or entirely identified. The T3SS1 and T6SS2, fitness attributes of *V. parahaemolyticus*, were found in whole and in part among 103 (98.09%) and 104 (99.04%) isolates, respectively. T6SS1 secretion systems were found in 64 (60.95%) isolates. The dendrogram created using hierarchical clustering revealed two distinct clades of isolates, one with hemolysin genes and the other lacking them (24STDH1 being exceptional), further the second clade is divided into two branches mainly based on presence/absence of T6SS1 and other virulence genes (Fig. 1).

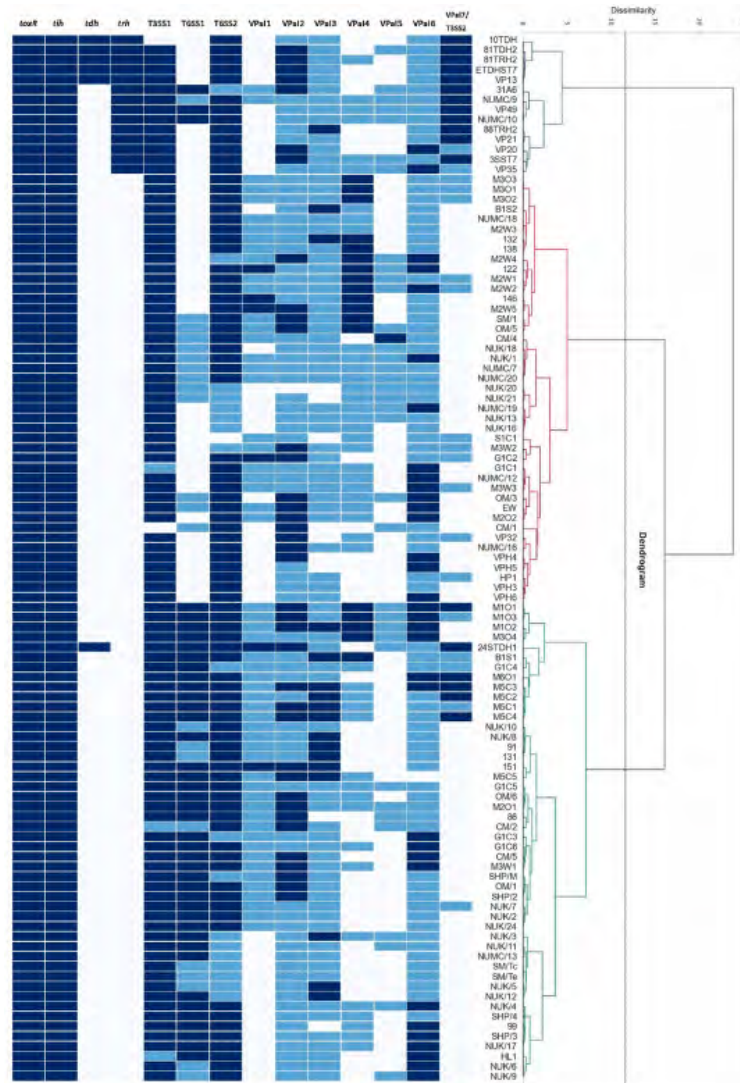


Fig. 2. Dissimilarity index of Euclidean distance matrix-based clustering showing the presence and absence of different virulence and pathogenicity islands in *Vibrio parahaemolyticus* (n = 105) analyzed in this study (Dark blue bars – Complete, Light blue bars – Partial, and colour less bars – Absent).

All the isolates used for cytotoxicity assay were previously confirmed for their adherence to the HeLa cells monolayer (Data not shown). The experimental results were normalized to 100% cytotoxicity induced by reference strain AQ4037, 4h after infection. Infected HeLa cells exhibited cell rounding and swelling (Figure S1), whereas uninfected HeLa cells had a regular cell appearance, and no cytotoxicity was observed throughout the experiment. The potential toxigenic strains of *V. parahaemolyticus* caused more than 90% cell death after 4h of infection, while non-pathogenic *V. parahaemolyticus* isolates caused approximately 60–70% cell death after 4h of infection, as measured by the LDH release assay (Fig. 3A). The percentage of cytotoxicity between reference strain AQ4037 and potentially pathogenic *V. parahaemolyticus* isolates did not differ. In contrast, the percentage of cytotoxicity

between pathogenic isolates of *V. parahaemolyticus* and non-pathogenic *V. parahaemolyticus* did vary significantly ($P < 0.01$). All isolates' cell-free supernatant failed to cause cell death in HeLa cells, indicating a significant difference ($P < 0.05$) between the percentage of cytotoxicity induced by cell-free supernatant and bacteria in HeLa cells (Fig. 3B).

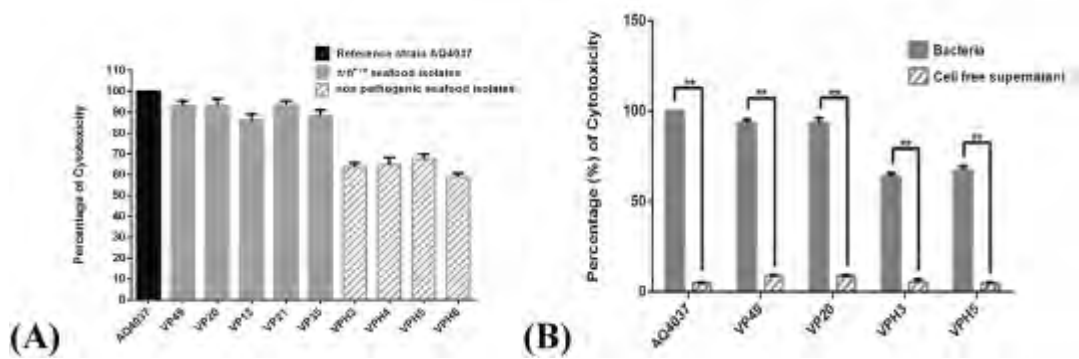


Fig. 3. (A) *V. parahaemolyticus* induced cytotoxicity in HeLa cells as measured by Lactate dehydrogenase (LDH) release assay. The results represent the means of three independent determinations, with bars showing one standard deviation. The significance of differences in the percentage of cytotoxicity was determined by Student's *t*-test ($P < 0.01$). (B) Effect of bacteria and bacteria free supernatant on the HeLa cells as measured by LDH release assay. The results represent the mean \pm SD of three independent replicates. The significant of differences between effect of bacteria and bacterial free supernatant was determined by Student's *t*-test ($P < 0.05$).**

The qPCR results (Fig. 4) for reference strain AQ4037 showed that all the analyzed genes in this study were upregulated during bacterial adherence to HeLa cells with a 4-fold rise in expression of *trh* and *vopC* genes and a 5-fold increase in *vopA* gene expression as compared to unadhered bacteria. The *trh* encoding seafood isolates VP49 and VP35 showed similar upregulation in gene expressions, wherein a 3-fold increment in the *trh*, *vopC* gene expression in both isolates was observed. *vopA* gene expression was upregulated 5-fold in VP49 and 3-fold in VP35 isolates. In all three isolates a significant difference ($P < 0.01$; and $P < 0.05$) in the expression of all the genes was observed considering unadhered and adhered cells determined by the student's *t*-test.

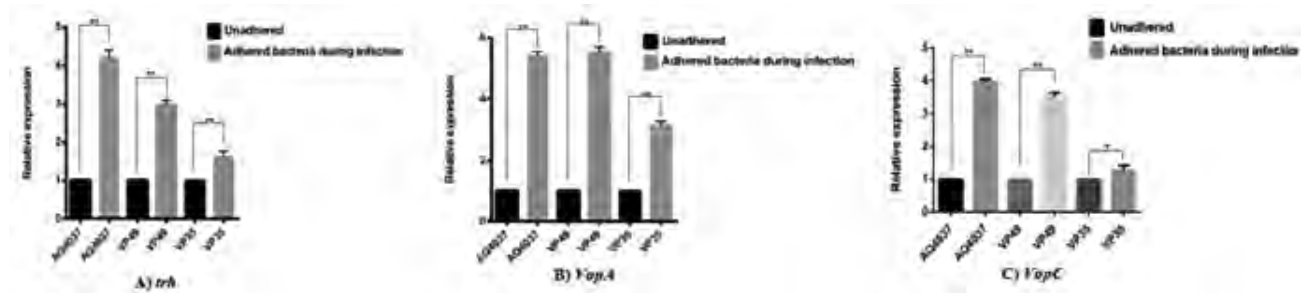


Fig. 4. Expression of virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* adhered to HeLa cells during infection at 4h. RNA was extracted (adhered and un-adhered *V. parahaemolyticus*) for estimating the expression of *trh*, *vopA* and *vopC* by qPCR. The expression was normalized using the housekeeping gene *rpoA*. Relative expression levels were calculated as the ratio of gene expressed in adhered to that in unadhered *V. parahaemolyticus*, which was arbitrarily defined as 1. The significance of differences determined by Student's *t*-test and is indicated as follows: **, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$.

(3) Announcement of results

The outcome of the study has been published in the journal of Microbial Pathogenesis (Impact factor= 3.848)

Prithvisagar KS, **Kodama T**, Rai P, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I, **Ballamoole KK**. Non-clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* harboring traits of potential pathogenicity and fitness: A molecular analysis. Microbial Pathogenesis. 2023 Mar 15:106069.

6. Self-evaluation

Thank you for giving us an opportunity to collaborate with Prof Toshio Kodama to work on pathogenomic and functional analysis to unravel the pathogenic potential of epidemic strains of *V. parahaemolyticus* from environmental sources. In the joint project, we have made substantially good progress in order to answer the proposed research question. As an outcome of the joint collaborator, a research publication highlining the potential pathogenicity and fitness traits among the non-clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* has been published in an International Journal “Microbial Pathogenesis”.

7 . Attainment level (circle one of I to IV below)

I (Few expected results were achieved.)

II (Not fully satisfied, but certain results were achieved.)

III (The expected results were attained with full satisfaction.)

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：放射線グラフト重合技術を活用した抗ウイルス性銀担持繊維の開発
課題番号：2022-Ippan-20

2. 代表者：保科宏行（量子科学技術研究開発機構・主幹研究員）
共同研究者：瀬古典明（量子科学技術研究開発機構・プロジェクトリーダー）
Mya Myat Ngwe Tun（長崎大学熱帯医学研究所・准教授）
森田公一（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

3. 決定額：300千円

4. 研究計画

① 研究目的

コロナ禍が長期化する中、抗ウイルス性材料に対する世の中のニーズが高まっている。しかしながら、今もなお効果の持続性がある汎用性の抗ウイルス性材料の開発ができていない状況にある。本研究では、マスクや白衣等の素材であるポリエチレンやセルロースなどの高分子繊維に、様々な機能を化学的に結合可能な放射線グラフト重合技術を活用することで汎用性のある抗ウイルス性材料を開発する。具体的には、電子線を活用するグラフト重合により繊維素材にリン酸基を固定化し、これに抗ウイルス効果が期待できる銀を均一、且つ強固に結合させることで、効果の持続性と安定性のある素材に機能化する。抗ウイルス性能の高い繊維材料を開発することで、最終的には汎用品であるマスクや医療用防護服などへ適用を目指す。

② 研究内容

量研の役割：

繊維状高分子基材に銀を担持させた抗ウイルス性材料を合成する。銀含有量と抗ウイルス効果の相関性を検討するため、銀含有量が異なる材料を合成する。また、弱酸性～弱アルカリ溶液を用いて洗浄を行い、銀の脱離挙動を評価する。

熱研の役割：

量研が合成する銀担持材料の抗ウイルス性評価を担当する。

双方で得られた結果を基に、抗ウイルス性材料として機能するために最適な銀含有量等の条件を決定することで、最も効果が高い抗ウイルス性材料を創出することを目指す。

③ 予想される成果

本共同研究で開発する抗ウイルス性材料は、繊維状の高分子素材に化学的に共有結合させることで強固に銀を担持できるため、高い安全性と抗ウイルス効果を併せ持つ材料である。2021年度の共同研究では、銀を固定化した不織布繊維にCovid-19（SARS-CoV-2）を付着させ、接触後60分でウイルスを不活化できることを確認している。2022年度の共同研究では、社会実装を意識して銀担持繊維の高精度化を図り、

早期実用化を目指す。本研究で用いる技術は、新種株のウイルスに対しても瞬時に対応できる特長を有しており、新種株に効果の高い薬剤等が解明された時点で、即座にこれを高分子化できることから、今後のパンデミックに対しても早期の材料開発に繋げることができる。さらに、本研究成果は、社会実装により社会へ貢献できるだけでなく、創製技術や評価技術として、学術的に大きなインパクトを与えることができる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

抗ウイルス性銀担持繊維は、量子科学技術研究開発機構が有する放射線グラフト重合技術を活用して合成した。図1に銀担持繊維の合成スキームを示す。まず、径が10～20 μmの細い単繊維から成るポリエチレン製不織布基材に電子線を照射し、化学結合の重合開始点となるラジカルを生成させた。次に、銀の強固な固定化（担持）に必要なリン酸基を基材へ導入するため、グラフト重合に必須なビニル基とリン酸基の双方を有する Bis[2-methacryloyloxyethyl] hydrogen phosphate を用いてグラフト重合を行った。モノマー濃度が5%のグラフト反応溶液に、照射した基材を浸漬し、40℃で2時間反応させた。得られたグラフト重合材を1 mMの硝酸銀溶液に浸漬させてグラフト重合で導入したリン酸基に銀を結合させることで銀担持繊維を得た。得られた銀担持繊維の銀担持量は、反応前後の硝酸銀溶液中の銀濃度を誘導結合プラズマ発光分光装置（ICP-AES）により定量することで算出した。

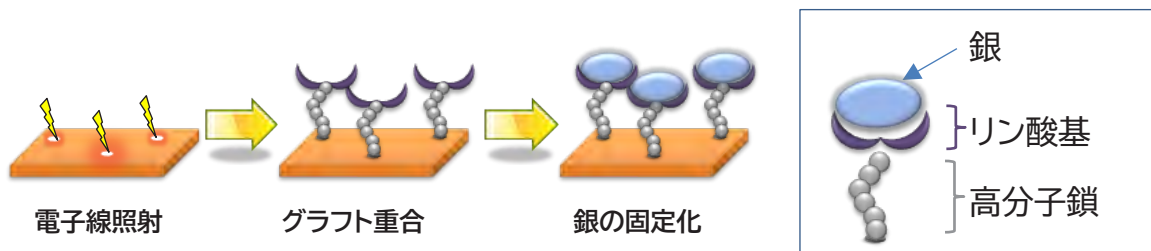


図1 放射線グラフト重合による銀担持繊維の合成スキーム

合成した銀担持繊維の抗ウイルス性能は、SARS-CoV-2の試験株を、銀担持繊維と所定時間接触させた後、2日間培養し、ウイルス粒子をフォーカスフォーミングアッセイにより測定することで評価した。

前年度の共同研究において、銀含有量が1%以上の銀担持繊維をウイルスと1時間接触させることで、99.9%以上のウイルスを不活化できることが明らかになっていたが、本年度は、経年が及ぼす抗ウイルス能への影響を調べるため、銀担持量が1.2%の銀担持繊維を合成し、大気下で1年間保管して酸化させた後(図2)、上記手法にて抗ウイルス性能を評価した。また、銀担持量と抗ウイルス能の相関

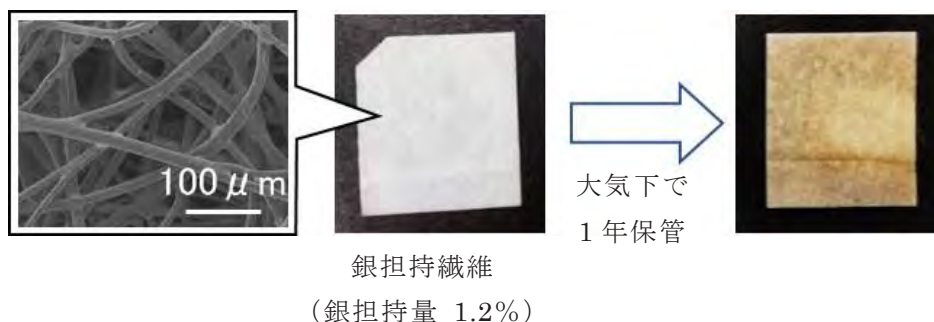


図2 銀担持繊維の経年変化

性を評価するため、銀担持量が0.4%の銀担持繊維を用いて同様に評価試験を行った。銀の担持量は、グラフト重合材の硝酸銀溶液への浸漬時間により調整し、3時間及び24時間の浸漬で銀担持量はそれぞれ0.4%、1.2%だった。

② 成果

1cmφに切り出したポリエチレン製不織布基材及び銀担持繊維に、患者飛沫に見立てた新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を滴下し、室温にて一定時間（15分、30分、45分、60分）接触させた後、ウイルスを2日間培養し、フォーカスフォーミングアッセイによりウイルス粒子数を測定した。その結果、不織布基材については、1時間の接触においてもウイルス数の大幅な減少は認められなかった。一方、合成から1年経過した銀担持繊維（銀担持量1%）については、僅か15分の接触でウイルス数が10 FFU/ml未満（検出限界以下）になり、経年（1年間）による抗ウイルス能の低減は認められなかった（図3）。また、銀担持量が0.4%の繊維については、15分の接触でウイルス数が700 FFU/mlまで低減し、30分の接触で10 FFU/ml未満になった。これらの結果から、銀担持量の増加に伴い、抗ウイルス効果も高くなり、1%以上の銀を繊維に担持させることで15分の接触で殆どのウイルスを不活化できることがわかった。

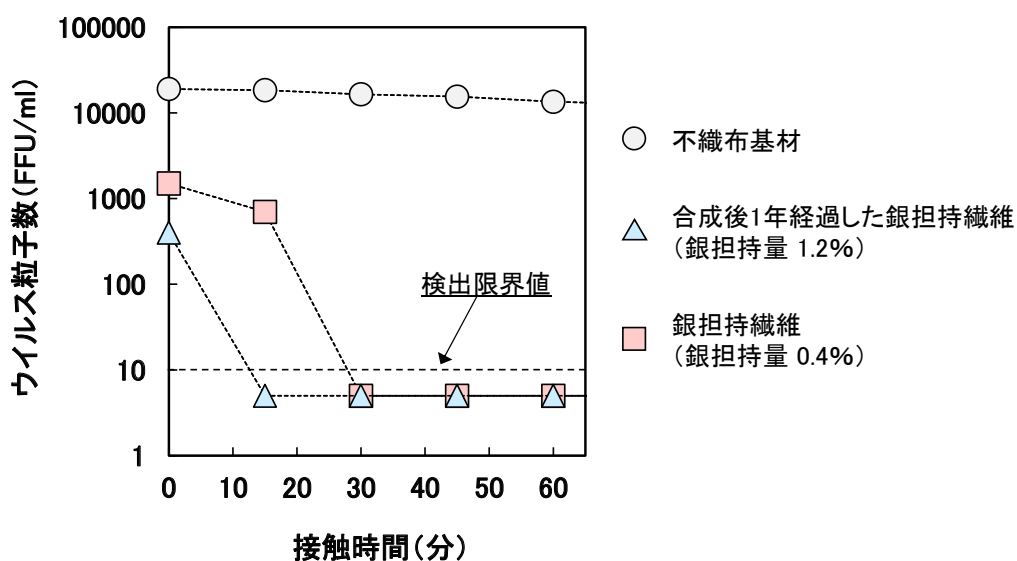


図3 銀担持繊維の抗ウイルス性効果

③ 成果の公表

現時点では成果発信を行っていないが、今後論文や学会発表などを通して公表する予定である。

6. 自己評価

本共同研究では、量子科学技術研究開発機構が開発した銀担持繊維の抗ウイルス性評価を長崎大学 熱帯医学研究所で実施した結果、銀担持繊維と15分間接触させることでSARS-CoV-2の99.9%以上を不活化することに成功した。また、合成後1年が経過した繊維についても抗ウイルス能が低下しないことを明らかにした。開発した銀担持繊維は、高い抗ウイルス効果と持続性を併せ持つ材料であることから、昨今需要の高い、抗ウイルス性製品への展開が大いに期待できる。

本共同研究では、学術的に意義の有る成果を得られたことに加え、社会実装により社会への貢献に繋がる知見を得られたことから、十分な成果を挙げられたと考えられる。

7. 達成度

I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名 : Discovery of antimalarial drug targeting mitochondrial parasites
from marine-associated bacteria

課 題 番 号 : 2022-Ippan-24

2. 代 表 者 : (Eijkman Research Center for Molecular Biology, National Research
and Innovation Agency・Researcher) Josephine Elizabeth Siregar

共 同 研 究 者 :

1. [Universitas Pendidikan Ganesha (Undiksha), Bali, Researcher] I Wayan Mudianta
2. (Marine Education and Research Organization (MERO) Foundation, Researcher) Rhesi Kristiana
3. [Marine Education and Research Organization (MERO) Foundation, Researcher] Ni Kadek Dita Cahyani
4. (Eijkman Research Center for Molecular Biology, National Research and Innovation Agency, Researcher) Andita Fitri Mutiara Rizki
5. (Eijkman Research Center for Molecular Biology, National Research and Innovation Agency, Researcher) Wihda Aisarul Azmi
6. (Dept of Molecular Infection Dynamics, NEKKEN, Associate Professor) Ken Daniel Inaoka
7. (Dept of Molecular Infection Dynamics, NEKKEN, Researcher) Takaya Sakura
8. (Dept of Molecular Infection Dynamics, NEKKEN, MSc Student, TMGH) Normalita Eka Pravitasari

3. 決 定 額 : 800 千円

4. 研究計画

① 研究目的

The final goal of this project is to develop an antimalarial drug targeting mitochondrial parasite from Indonesian marine bioresources with the use of *P. falciparum* and *P. berghei*. As the initial step towards the drug development, during this project (1 year) we will focus on identification of active extracts from cultured marine-associated bacteria collected in Indonesia, that is largely unexplored for development of drugs targeting infectious diseases. Once the active extract is identified, the bioactive component will be purified for further analysis.

② 研究内容

The discovery of antimalarial candidate from marine-associated bacteria in this project will use bioassay-guided isolation method, the gold-standard method which recently has been used in the drug discovery program. The duration of this project is two years, and the detailed research plan as followed:

Year one will be focused on bacterial collection from various host including sponges, nudibranchs, algae, hydroid and bryozoa. Two different specimens of each host will be collected during the sampling campaign. The sampling permit will be applied from local government as well as from relevant permit issuing body. Next, we expect to obtain 20 bacterial strains from each specimen and therefore, a total of 200 bacterial strains. The specimens will be frozen at freezer -26°C while the bacterial glycerol stocks will be stored at -80°C freezer at MERO laboratory. Bacteria culture will be extracted by ethyl acetate (EtOAc) because of medium polarity and minimum cell toxicity enabling extraction of both polar and non-polar compounds. Next, the EtOAc crude extracts ($\pm 50\text{ mg}$) will be used to conduct the initial *ex vivo* antimalaria activity assay (*P. berghei*) at Eijkman. Subsequently, the culture of strain(s) associated to the most promising antimalarial activity will be scaled up to obtain additional crude extracts ($\pm 1\text{ g}$) to perform further biochemical (bc_1 complex and PfDHODH), and *in vitro* assays (*P. falciparum* 3D7 and yDHODH-3D7) at NEKKEN. Our previous experience under SATREPS project, a relatively high hit rate of $\sim 10\%$ at cell-based screening was obtained from microbial culture extract. Thus, hit extracts will be prioritized by prediction of metabolite content by LC-MS/MS and Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS) analysis for de-replication (exclusion of extracts with similar content), and to detect and search for compounds and even new metabolites in the initial crude extracts by comparison of the data to the dedicated database. In addition, this early detection method of the extracts would secure that the purified antimalarial metabolites are the natural product presented in the crude extracts and not artifacts or derivatives resulted from multiple chromatographic separations.

Year two will be dedicated to separate and purify the most promising extracts guided by *in vitro* antimalarial assay. The initial separation and purification step of the extracts involves liquid-liquid partition between water-hexane, water-EtOAc, and water-butanol. Subsequently, the most antimalarial active fractions will be chromatographed on silica gel to provide the most promising subfractions. Finally, the subfractions will be sent for HPLC to obtain purified compounds that will be confirmed as the metabolites responsible for the antimalarial activity observed in the crude extracts as well as fractions and subfractions. Next, the structures of the purified molecules including the absolute configuration will be elucidated by 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

Table research detail:

Year One	
Research Activity	Details
Sampling	Collecting marine sediment and marine invertebrate in Bali
Bacterial Isolation and purification	Collecting list of marine bacteria at MERO Foundation Laboratory, Bali
Mass Culture	Collecting crude extract bacteria at MERO Foundation Laboratory, and Undiksha laboratory in Bali
Screening antimalaria test 1 and mitochondria assay	Antimalaria testing 1 at Eijkman Research Center for Molecular Biology and mitochondria assay at NEKKEN
Identification of chemical composition by LCMS/MS	Information of profiling compound
Year Two	
Research Activity	Details
Large-scale culture	Collecting large amount of crude extract form bacteria culture at MERO Foundation Laboratory
Analysis and comparing compound by Global Natural Product Social Molecular Networking (GNPS)	Observation of promising metabolite
Compound purification by chromatography method and antimalarial test 2	Separation chemical compound at Undiksha Laboratory and antimalarial test at Eijkman Research Center for Molecular Biology
Identification active compound by NMR	Finding a pure compound
Evaluation antimalarial test 3	At Eijkman Research Center for Molecular Biology
Validation of bioactive purified compounds targeting <i>P. falciparum</i> mitochondria	biochemical assays and yDHODH-3D7 strain (in collaboration with NEKKEN)

The research proposed here is synergized with research activity at Daniel Inaoka' s Laboratory (NEKKEN) which had developed several malaria mitochondria target assay systems. Recently, they have been also working on extracts derived from culture of Nagasaki' s marine-associated microbes as an antimalaria candidate.

The budget from the current proposal will be used to cover travel expenses to bring and assay the extracts/purified compounds to Dr. Daniel Inaoka's laboratory at NEKKEN and support part of the research activities in Indonesia. During the visit to NEKKEN, experimental techniques to malaria mitochondrial assay will be learned in order to extend the research capacities at the Eijkman Research Center for Molecular Biology. All remaining samples will be brought back to Indonesia after data collection.

Such kind of integrated international research collaboration proposed herein will advance the scientific knowledge in drug development targeting infectious diseases.

③ 予想される成果

Me and Dr. Daniel Inaoka finished the PhD course in the same department under supervision by Prof. Kiyoshi Kita at the University of Tokyo. After returning to Indonesia, we have started collaboration under the SATREPS program led by Dr. Tomoyoshi Nozaki (2015-2020) and have identified several compounds from Indonesian Bioresources focused on soil-derived microorganisms and plant, that are active against malaria and amoebiasis.

Furthermore, in order to train young scientist, one of my staff (Normalita Eka Pravitasari) is now engaged in Master course in Nagasaki University under Daniel Inaoka's supervision and supported by MEXT scholarship, and is currently conducting similar experiments using extracts from microorganisms isolated in Ohmura Bay (Nagasaki), in collaboration with Prof. Kohsuke Takeda (Nagasaki University).

We have started to collect and isolate the microorganisms from marine samples and as soon as the current proposal is funded, we will start the preparation of microorganism culture, and the butanolic extracts.

Output target for 2 years: publication.

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

(Report of the research activities conducted during the FY2022)

The research activities conducted during the FY2022 are as followed:

1. Samples of marine-associated bacteria were prepared by Universitas Pendidikan Ganesha (Undiksha) in Singaraja, Bali, and the Marine Education Research and Organization (MERO) Foundation. Two hundred strains of marine-associated bacteria were cultured and extracted from five specimens of various invertebrates: 49 bacteria were extracted from sponges, 29 from algae, 24 from hydroids, 13 from bryozoans, and 85 from nudibranchs. The collection of specimens was carried out under a permit from the local government. The strains were securely stored in a freezer at -80°C . Samples of cultured bacteria were extracted and sent to Eijkman-BRIN and Nagasaki University for screening of antimalarial activity.
2. Screening of antimalaria activity using *ex vivo* culture of *P. berghei* was conducted by Eijkman Research Center for Molecular Biology, National Research and Innovation Agency.
3. Active extracts were further investigated for activity on the mitochondrial electron transport chain (ETC) of the parasite at the Department of Molecular Infection Dynamics, Nagasaki University, Japan.
4. Principal Investigator (Josephine E. Siregar) visited Nagasaki University.

② 成果（結果＋考察）

1. We have successfully collected 200 dried extracts of marine-associated bacteria. These samples were distributed to Eijkman-BRIN for screening of antimalarial activity using *ex vivo* culture of *P. berghei*, and to Nagasaki University for further screening of antimalarial activity using *P. falciparum* wild type 3D7 and yDHODH-3D7 to identify extracts targeting the mitochondrial ETC.
2. Approximately 177 samples of dried extracts from marine-associated bacteria were screened for their potential antimalarial activity against *P. berghei*, while the remaining 23 samples have not been analyzed yet (see Appendix 1). Out of the screened samples, 33 showed promising results as they exhibited inhibition of the asexual blood stage of *P. berghei ex vivo* at a concentration of $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$, surpassing the 80% inhibition cutoff (Figure 1). These samples are considered potential candidates for further analysis targeting the malarial mitochondrial ETC.

Marine extracts - Primary screening

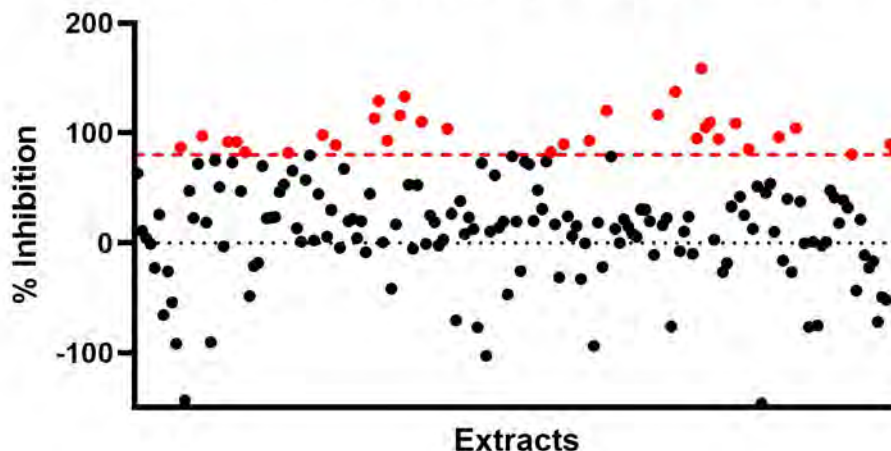
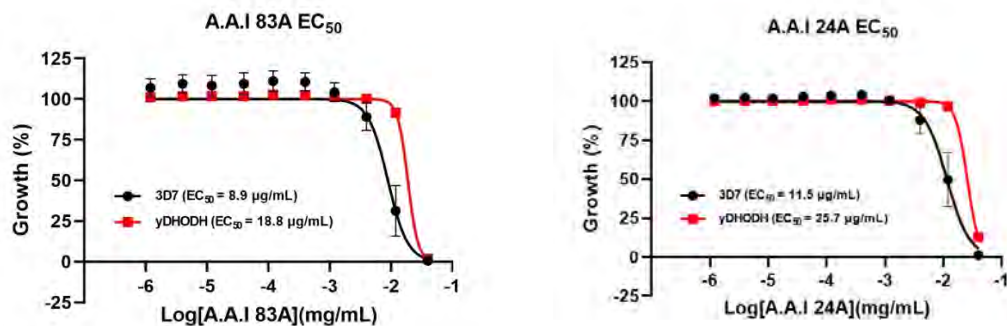


Figure 1. 177 samples of dried extracts from marine-associated bacteria have been screened for their potential antimalarial activity against *P. berghei*, and 33 samples have shown potential antimalarial activity (indicated in red). The threshold for activity is 80% growth inhibition.

- Out of the 33 samples showing potential antimalarial activity against *P. berghei*, 13 samples were further analyzed for their inhibition of *P. falciparum* growth at Nagasaki University. Among these, 10 samples demonstrated inhibition of *P. falciparum* growth, confirming their efficacy against both *P. berghei* and *P. falciparum*. Additionally, 10 out of the 13 samples were analyzed for their potential to target mitochondrial ETC. However, none of the samples have shown specific targeting of the mitochondrial ETC up to the present, as indicated in Figure 2.



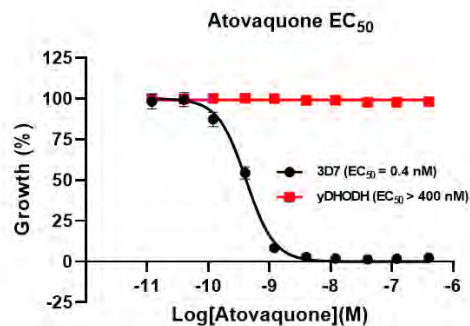
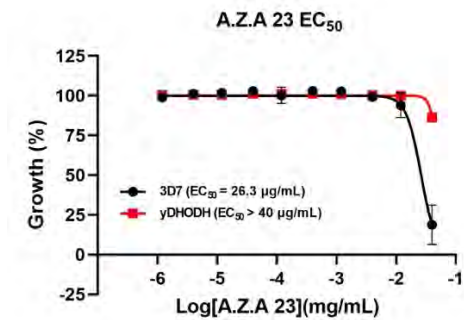
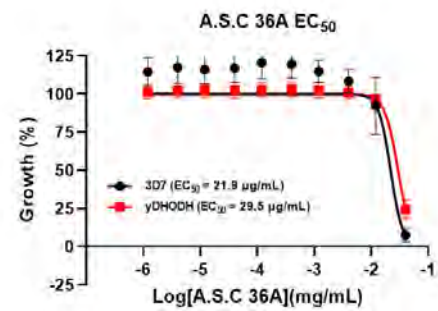
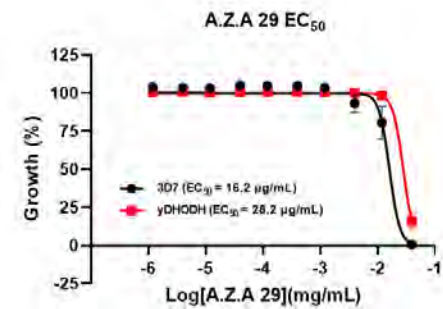
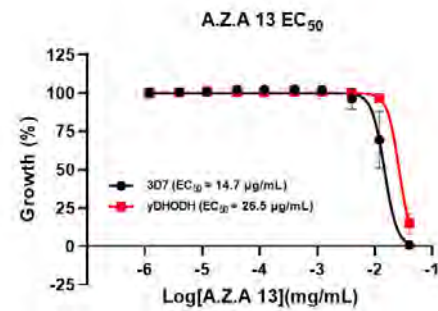
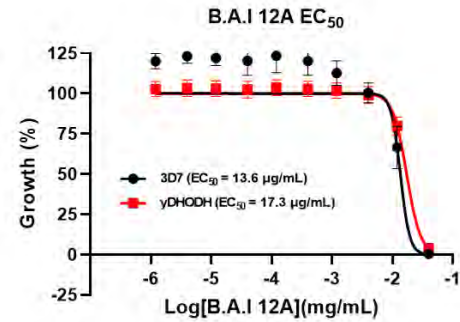
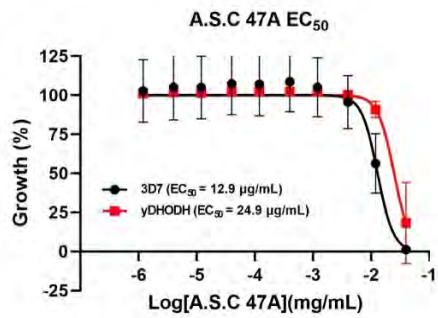
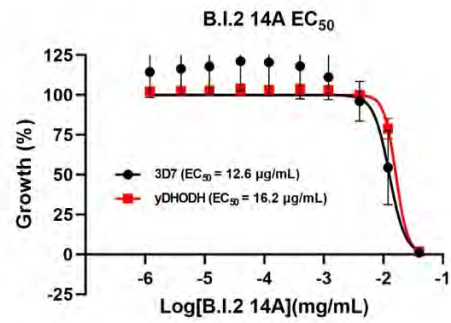
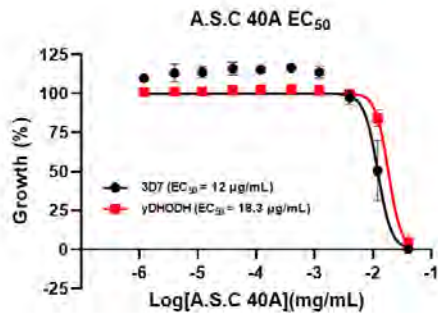


Figure 2. The EC₅₀ values of the 10 selected samples (from the primary screening against *P. berghei*) were determined using two different strains: the *P. falciparum* 3D7 isolate (Pf3D7) represented by black dots, and the 3D7 transgenic-yDHODH strain represented by red squares. The EC₅₀ values of the extracts varied within a certain range, indicating their potency as shown in Table 1.

Table 1. EC₅₀ values of extracts ranked according to potency

Samples	EC ₅₀			yDHODH/3D7 ratio
	<i>P. berghei</i> (µg/mL)	<i>P. falciparum</i> 3D7 (µg/mL)	yDHODH (µg/mL)	
A. A. I 83A	<1	8.9	18.8	2.11
A. A. I 24A	24.1	11.5	25.7	2.23
A. S. C 40A	<1	12.0	18.3	1.53
B. I. 2 14A	<1	12.6	16.2	1.29
A. S. C 47A	36.1	12.9	24.9	1.93
B. A. I 12A	<1	13.6	17.3	1.27
A. Z. A 13	<1	14.7	26.5	1.80
A. Z. A 29	<1	16.2	28.2	1.74
A. S. C 36A	<1	21.9	29.5	1.35
A. Z. A 23	<1	26.3	>40	>1.52
Atovaquone (ctrl)	<1	0.5 nM	>400 nM	>800

The EC₅₀ values of the extracts against *P. berghei* ranged from <1 to 36.09 µg/mL, while in *P. falciparum* 3D7 ranged from 8.9 to 26.3 µg/mL. The antimalarial drug atovaquone, used as the positive control, demonstrated inhibition of *P. falciparum* 3D7, but not the mutant yDHODH. For those extracts with EC₅₀ value against *P. berghei* that less than 1 µg/mL, need to be determined further.

- Principal Investigator Josephine E. Siregar visited Nagasaki University from March 15th to March 24th, 2023, to conduct research activities on screening antimalarial properties against *P. falciparum*. During this period, she collaborated with Normalita, a Master's student at Nagasaki University.
- Furthermore, we will proceed with the analysis of the remaining hit samples to identify their mitochondria antimalarial targets. Additionally, we

will collect a substantial amount of crude extract from potential bacterial cultures that exhibited antimalarial activity in the hit extract. The hit extract(s) will undergo LC-MS/MS analysis to determine the composition of secondary metabolites.

③ 成果の公表

Malaria is a significant public health problem in many parts of the world, affecting approximately 40% of the global population, especially those residing in the world's poorest countries. According to the World Health Organization's report in 2021, there were an estimated 241 million malaria cases and 627,000 malaria-related deaths worldwide in 2020. This represents an increase of about 14 million cases compared to 2019, along with 69,000 additional deaths. Approximately two-thirds of these extra deaths (47,000) were attributed to disruptions in the provision of malaria prevention, diagnosis, and treatment during the pandemic. Indonesia also continues to face the challenge of malaria as a significant health issue.

Strategies to control malaria that have shown some success include providing anti-malaria treatment for infected individuals, applying insecticides to reduce mosquito populations, and promoting the use of bed nets to minimize human contact with infected mosquitoes. However, the rapid spread of parasite resistance to the currently available antimalarial drugs has hindered large-scale efforts in malaria control in recent years. There is an urgent need to discover new antimalarial agents to address this challenge.

Natural products have been utilized in the treatment of various diseases, including malaria, and they hold great significance as they are deeply intertwined with the cultural diversity and traditions of Indonesia's rich biodiversity. Three major antimalarial drugs widely used today, namely atovaquone (a derivative of lapachol), quinine, and artemisinin, were originally discovered or derived from active compounds found in traditional medicines used by indigenous people in Brazil, Peru, and China, respectively. This evidence highlights the growing recognition of the potential of natural products, which may contribute to the development of much-needed new antiparasitic drugs specifically targeting malaria.

We previously collected samples of marine-associated bacteria from Tulamben, Bali, Indonesia, through the MERO Foundation. A total of 200 dried extract samples were prepared from specimens of various invertebrates, involving contributions from both the MERO Foundation and Undiksha. The availability

of a potential development of an *ex vivo* fluorescence-based screening method in the *Plasmodium berghei* model was utilized to investigate the activity of antimalarial properties in the prepared samples, conducted by Eijkman-BRIN. Out of the 177 dried extract samples screened for their potential antimalarial activity in *P. berghei*, 33 samples exhibited inhibition of the growth of *P. berghei*. These samples hold potential for further analysis regarding their mitochondrial target as antimalarial agents.

The mitochondrial electron transport chain (ETC) from *P. falciparum* contains several drug targets, including complex III (bc_1 complex; targeted by atovaquone) and dihydroorotate dehydrogenase (DHODH; targeted by DSM265). Nagasaki University have developed assay systems capable to identify compounds targeting these two enzymes, which were utilized for the continuation of screening specific targets for antimalarial activity. The extracts that affect the ETC will be validated using a *P. falciparum* 3D7 strain expressing yeast DHODH (yDHODH-3D7). Thirteen samples have been screened for their antimalarial activity targeting the mitochondria. Although, 10 extracts inhibiting the growth of both *P. berghei* and *P. falciparum* could be successfully identified, they were inactive against the *P. falciparum* mitochondrial ETC. Further analysis will be conducted on the remaining samples.

6. 自己評価

1. Problems with Purchasing Order Reagents:

- Miscommunication of system in managing grant funding from Nagasaki University at initial step of this project (order reagents for culture and extraction samples and reimbursement process).
- Challenges with the transportation system for importing reagents from vendors.

2. Issues with Letter of Agreement (LoA) and Material Transfer Agreement (MTA):

- Delays caused by a slow bureaucracy system in handling these agreements.

3. Insufficient Funding:

- Inadequate funding for this project, necessitating the use of support budget from other grants to fund it, specifically on the process of culturing and extracting samples.

7. 達成度 (何れかに○)

I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
(The expected results were hardly achieved.)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
(Dissatisfaction remains, but some results were achieved)

III (予想通りの成果を挙げられた)
(Achieved predictable results)

IV (予想以上の成果を挙げられた)
(Achieved better than expected results)

評価を下した理由

Out of the five research activities listed in the table, 23 extracts could not be assayed in the “Screening antimalaria test 1 and mitochondria assay”, and “Identification of chemical composition by LCMS/MS” could not be finished during the FY 2022. Therefore, the LC-MS/MS profile of the hit extracts identified in the first year will be conducted in the second year (FY 2023).

Appendix 1 Results of dried extract of marine-associated bacteria as for the antimalarial activity against *P. berghei*

No	Source of specimen	Type of Microbe	Sample Code	% inhibition <i>P. berghei</i>
				100 µg/mL
1	<i>Costasiella</i> sp.	Bacteria	A. ZA. 1*	N. D
2		Bacteria	A. ZA. 2*	62.0
3		Bacteria	A. ZA. 3*	N. D
4	Algae <i>Costasiella</i> sp.	Bacteria	A. ZA. 4*	11.1
5		Bacteria	A. ZA. 5*	4.60
6		Bacteria	A. ZA. 6*	-0.700
7		Bacteria	A. ZA. 7*	-22.7
8	Hydroid D. <i>greenamyeri</i>	Bacteria	A. ZA. 8*	26.2
9		Bacteria	A. ZA. 9*	-65.6
10		Bacteria	A. ZA. 10*	-25.9
11	<i>D. greenamyeri</i>	Bacteria	A. ZA. 11*	-54.2
12		Bacteria	A. ZA. 12*	-91.8
13		Bacteria	A. ZA. 13*	86.8
14	Sponge <i>Mexichromis</i> <i>trilineata</i>	Bacteria	A. ZA. 14*	N. D
15		Bacteria	A. ZA. 15*	N. D
16		Bacteria	A. ZA. 16*	-143
17		Bacteria	A. ZA. 17*	47.1
18		Bacteria	A. ZA. 18*	N. D
19	<i>Mexichromis</i> <i>trilineata</i>	Bacteria	A. ZA. 21*	22.9
20		Bacteria	A. ZA. 22*	71.9
21	Algae <i>E. pusila</i>	Bacteria	A. ZA. 23*	97.3
22		Bacteria	A. ZA. 24	18.8
23		Bacteria	A. ZA. 25	-90.4
24	<i>E. pusila</i>	Bacteria	A. ZA. 26*	74.8
25		Bacteria	A. ZA. 27*	50.6
26		Bacteria	A. ZA. 28*	-3.20
27	<i>Eubranchus</i> sp.	Bacteria	A. ZA. 29*	91.6
28	<i>Costasiella</i> sp.	Actinobacteria	A. AI. 1A *	73.1
29		Actinobacteria	A. AI. 2A*	91.7
30		Actinobacteria	A. AI. 3A*	46.7
31		Actinobacteria	A. AI. 4A*	82.2
32	Algae <i>Costasiella</i>	Actinobacteria	A. AI. 5A*	-48.4
33	sp.	Actinobacteria	A. AI. 7A*	-21.0

34		Actinobacteria	A. AI. 8A*	N. D
35		Actinobacteria	A. AI. 10A	-17.9
36		Actinobacteria	A. AI. 11A*	69.9
37		Actinobacteria	A. AI. 12A*	22.4
38		Actinobacteria	A. AI. 14A*	23.0
39		Actinobacteria	A. AI. 17A*	23.7
40		Actinobacteria	A. AI. 18A*	46.1
41	Hydroid <i>D. greenamyeri</i>	Actinobacteria	A. AI. 20A*	N. D
42		Actinobacteria	A. AI. 23A*	52.8
43		Actinobacteria	A. AI. 24A*	81.8
44		Actinobacteria	A. AI. 25A*	N. D
45		Actinobacteria	A. AI. 28A	65.3
46	<i>D. greenamyeri</i>	Actinobacteria	A. AI. 31A*	13.4
47		Actinobacteria	A. AI. 32A*	1.10
48	Sponge <i>Mexichromis trilineata</i>	Actinobacteria	A. AI. 34A*	N. D
49		Actinobacteria	A. AI. 35A*	57.0
50		Actinobacteria	A. AI. 38A*	79.4
51		Actinobacteria	A. AI. 39A*	2.30
52		Actinobacteria	A. AI. 40A*	44.1
53		Actinobacteria	A. AI. 41A*	N. D
54		Actinobacteria	A. AI. 42A*	97.1
55		Actinobacteria	A. AI. 44A*	N. D
56	<i>Mexichromis trilineata</i>	Actinobacteria	A. AI. 48A*	5.80
57		Actinobacteria	A. AI. 49A*	29.9
58		Actinobacteria	A. AI. 50A*	88.8
59		Actinobacteria	A. AI. 52A*	-4.30
60		Actinobacteria	A. AI. 53A	67.2
61		Actinobacteria	A. AI. 55A*	20.0
62		Actinobacteria	A. AI. 57A*	21.9
63		Actinobacteria	A. AI. 58A*	N. D
64	Algae <i>E. pusila</i>	Actinobacteria	A. AI. 65A*	4.40
65		Actinobacteria	A. AI. 66A*	19.9
66	<i>E. pusila</i>	Actinobacteria	A. AI. 68A*	-8.50
67		Actinobacteria	A. AI. 69A*	44.5
68		Actinobacteria	A. AI. 70A*	113
69		Actinobacteria	A. AI. 72A*	N. D
70	<i>Eubranchus</i> sp.	Actinobacteria	A. AI. 74A*	129
71		Actinobacteria	A. AI. 75A*	0.500

72		Actinobacteria	A. AI. 76A*	92.8
73		Actinobacteria	A. AI. 79A*	N. D
74	Hydroid <i>Eubranchus</i> sp.	Actinobacteria	A. AI. 81A*	-41.7
75		Actinobacteria	A. AI. 82A*	17.1
76		Actinobacteria	A. AI. 83A*	116
77		Actinobacteria	A. AI. 85A*	133
78		Actinobacteria	A. AI. 86A*	52.7
79		Actinobacteria	A. AI. 87A	-5.10
80		Actinobacteria	A. AI. 88A*	52.3
81		Actinobacteria	A. AI. 89A*	110
82	<i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. AI. 90A*	-0.900
83		Actinobacteria	A. AI. 91A*	25.0
84		Actinobacteria	A. AI. 92A*	19.1
85		Actinobacteria	A. AI. 93A*	-2.40
86		Actinobacteria	A. AI. 94A*	3.40
87		Actinobacteria	A. AI. 95A	103
88	Sponge <i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. AI. 97A*	26.7
89		Actinobacteria	A. AI. 98A*	-70.5
90		Actinobacteria	A. AI. 99A	37.6
91		Actinobacteria	A. AI. 100A*	8.20
92	<i>Costasiella</i> sp.	Actinobacteria	A. I2. 4A*	23.4
93	Sponge <i>Mexichromis trilineata</i>	Actinobacteria	A. I2. 21A*	13.0
94	<i>Mexichromis trilineata</i>	Actinobacteria	A. I2. 22A*	-76.8
95		Actinobacteria	A. I2. 23A*	72.3
96	Algae <i>E. pusila</i>	Actinobacteria	A. I2. 31A*	-103
97		Actinobacteria	A. I2. 34A*	10.6
98	Hydroid <i>Eubranchus</i> sp.	Actinobacteria	A. I2. 43A*	61.4
99		Actinobacteria	A. I2. 45A*	14.1
100	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoa)	Actinobacteria	A. I2. 50A*	19.5
101		Actinobacteria	A. I2. 51A*	-46.9
102		Actinobacteria	A. I2. 53A*	N. D
103	<i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. I2. 57A	78.5
104		Actinobacteria	A. I2. 58A*	19.7
105	Sponge <i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. I2. 59A*	-25.5
106		Actinobacteria	A. I2. 61A*	73.7
107		Actinobacteria	A. I2. 64A*	71.1
108		Actinobacteria	A. I2. 65A*	20.2
109		Actinobacteria	A. I2. 66A*	47.6

110		Actinobacteria	A. I2. 74A*	30.8
111		Actinobacteria	A. I2. 75A*	73.9
112		Actinobacteria	A. I2. 77A*	N. D
113		Actinobacteria	A. I2. 78A*	82.2
114		Actinobacteria	A. I2. 82A*	17.1
115		Actinobacteria	A. I2. 84A*	-31.4
116	<i>Costasiella</i> sp.	Actinobacteria	A. I2. 85A*	89.7
117		Actinobacteria	A. I2. 86A*	24.1
118		Actinobacteria	A. I2. 87A*	6.50
119	Algae <i>Costasiella</i>	Actinobacteria	A. I2. 89A*	15.5
120	sp.	Actinobacteria	A. I2. 90A*	-33.0
121	<i>D. greenamyeri</i>	Actinobacteria	A. I2. 91A*	-0.200
122	<i>E. pusila</i>	Actinobacteria	A. I2. 93A*	92.8
123	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoa)	Actinobacteria	A. I2. 94A*	-94.0
124	<i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. I2. 100A*	18.6
125		Actinobacteria	A. I2. 101A*	-21.8
126		Actinobacteria	A. I2. 105A*	120
127	Sponge <i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. I2. 109A*	78.1
128	<i>Mexichromis</i>	bakteri	A. AI. 17B*	13.0
129	<i>trilineata</i>	bakteri	A. AI. 19B*	N. D
130	<i>Costasiella</i> sp.	Actinobacteria	A. SC. 1A*	0.100
131		Actinobacteria	A. SC. 2A*	21.6
132	Algae <i>Costasiella</i> sp.	Actinobacteria	A. SC. 5A*	15.3
133		Actinobacteria	A. SC. 6A*	8.60
134		Actinobacteria	A. SC. 7A*	5.60
135		Actinobacteria	A. SC. 8A*	30.3
136		Actinobacteria	A. SC. 9A	30.1
137		Actinobacteria	A. SC. 10A*	20.0
138		Actinobacteria	A. SC. 13A*	-10.8
139	Hydroid <i>D. greenamyeri</i>	Actinobacteria	A. SC. 16A*	117
140	<i>D. greenamyeri</i>	Actinobacteria	A. SC. 17A*	16.3
141	Sponge <i>Mexichromis</i>	Actinobacteria	A. SC. 23A*	22.7
142	<i>trilineata</i>	Actinobacteria	A. SC. 25A*	-76.1
143	<i>Eubranchus</i> sp.	Actinobacteria	A. SC. 28A*	137
144		Actinobacteria	A. SC. 29A*	-7.50
145		Actinobacteria	A. SC. 30A*	10.5

146		Actinobacteria	A. SC. 31A*	N. D
147		Actinobacteria	A. SC. 32A*	23.9
148		Actinobacteria	A. SC. 33A*	-9.80
149	Hydroid <i>Eubranchus</i> sp.	Actinobacteria	A. SC. 34A*	94.9
150		Actinobacteria	A. SC. 35A*	159
151		Actinobacteria	A. SC. 36A*	105
152	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoa)	Actinobacteria	A. SC. 37A*	109
153		Actinobacteria	A. SC. 39A*	2.90
154		Actinobacteria	A. SC. 40A*	94.4
155		Actinobacteria	A. SC. 43A*	-26.4
156		Actinobacteria	A. SC. 44A*	-18.3
157		Actinobacteria	A. SC. 45A*	32.9
158		Actinobacteria	A. SC. 47A*	109
159		Actinobacteria	A. SC. 48A*	41.8
160		Actinobacteria	A. SC. 49A*	N. D
161	<i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. SC. 51A*	24.5
162	Sponge <i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. SC. 53A*	N. D
163	Hydroid <i>D.</i>	Actinobacteria	A. SC. 55A*	84.9
164	<i>greenamyeri</i>	Actinobacteria	A. SC. 56A*	13.0
165	<i>Mexichromis trilineata</i>	Actinobacteria	A. SC. 57A*	51.1
166	<i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. SC. 58A*	-147
167	Sponge <i>Hypselodoris roo</i>	Actinobacteria	A. SC. 59A*	45.3
168	<i>Halgerda willeyi</i>	Actinobacteria	B. AI. 4A*	53.3
169	<i>Polycera abei</i>	Actinobacteria	B. AI. 6A*	10.4
170	<i>Carminodoris grandiflora</i>	Actinobacteria	B. AI. 12A*	96.1
171		Actinobacteria	B. AI. 18A*	-16.0
172		Actinobacteria	B. AI. 20A*	39.8
173	<i>Halgerda willeyi</i>	Actinobacteria	B. I2. 1A*	-26.6
174	<i>Discodoris</i>	Actinobacteria	B. I2. 14A*	104
175	<i>boholiensis</i>	Actinobacteria	B. I2. 19A	N. D
176	<i>Carminodoris grandiflora</i>	Actinobacteria	B. I2. 20A*	37.3
177	<i>Atagama spongiosa</i>	Actinobacteria	B. I2. 35A*	-0.200
178		Actinobacteria	B. I2. 39A*	-76.5
179	<i>Halgerda willeyi</i>	Actinobacteria	B. SC. 1A*	1.10
180		Actinobacteria	B. SC. 3A*	-75.0

181		Actinobacteria	B. SC. 4A*	-2.30
182		Actinobacteria	B. SC. 6A*	0.800
183	<i>Discodoris boholiensis</i>	Actinobacteria	B. SC. 10A*	47.3
184	<i>Carminodoris grandiflora</i>	Actinobacteria	B. SC. 11A*	40.8
185	<i>Atagama spongiosa</i>	Actinobacteria	B. SC. 14A*	18.1
186	Sponge <i>Xestospongia testudinaria</i>	Actinobacteria	E. SP. 04-ISP2. 10 ² . 3*	38.5
187		Actinobacteria	E. SP. 04-ISP ² . 10 ² . 4*	32.2
188		Actinobacteria	E. SP. 04-AIA. 10 ³ . 3*	80.4
189	Sponge <i>Clathria</i> sp.	Actinobacteria	E. SP. 11-SCA. 10 ² . 2	-43.5
190	(A)	Actinobacteria	E. SP. 11-SCA. 10 ³ . 5*	21.4
191	Sponge <i>Haliclona</i> sp. "pinkish branch"	Actinobacteria	BS. SP. 10-ISP4. 10 ³ . 3*	-10.9
192	Sponge <i>Tetilla radiata</i>	Actinobacteria	BS. SP. 11-ISP2. 10 ² . 3. 2*	-22.3
193	Sponge <i>Clathria</i> sp. (B)	Actinobacteria	BL. SP. 06-AIA. 10 ³ . 9*	-16.6
194		Actinobacteria	BL. SP. 06-ISP2. 10 ² . 2*	-71.9
195		Actinobacteria	BL. SP. 06-ISP2. 10 ³ . 2*	-49.2
196	Sponge <i>Clathria mima</i>	Actinobacteria	BR. SP. 02b-AIA. 10 ³ . 1*	N. D
197		Actinobacteria	BR. SP. 02b-AIA. 10 ³ . 8*	-52.0
198	Sponge <i>Liosina</i>	Actinobacteria	B. 10. 1. 1	89.2
199	<i>granularis</i>	Actinobacteria	B. 10. 1. 8	83.1
200	Sponge (unknown species)	Actinobacteria	B. 10. 2. 1	N. D

= considered as hits by inhibiting the asexual blood stage of *P. berghei* *ex vivo* at a concentration 100 µg/mL with 80% inhibition cut-off.

N.D: Not determined.

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染後に出現する抗体が認識するウイルス抗原およびヒトタンパク質についての研究

課題番号：2022-Ippan-25

2. 代表者：大山 要（長崎大学病院薬剤部・教授）

共同研究者：相原希美（採択時：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科博士研究員、
現在：同 助教）

3. 決定額：400千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究では、LC-MS/MS を使う独自の抗原-抗体複合体（免疫複合体）解析法で患者検体を解析し、軽症患者（治癒後を含む）あるいは重症患者で特徴的に認められる抗体が体内で結合している抗原（以下、目的抗原）を特定する。次に、目的抗原の量を LC-MS/MS で選択的・高感度に定量する。抗原量は抗体の働きで増減し病勢と相関すると予想されるため、臨床判断の指標となる。さらに、免疫複合体からエピトープを特定する独自の LC-MS/MS 解析技術を使い、抗体と目的抗原が結合する免疫複合体の解析でエピトープを特定する。

② 研究内容

目的抗原タンパク質の特定（2021年度共同研究費で実施済み）

目的抗原は以下の2通りの比較解析から、軽症患者（治癒後を含む）あるいは重症患者の血清に特異的または統計的有意差をもって高頻度に検出される目的抗原を特定する。

1)患者間の比較として、重症患者と軽症患者の比較を行う。患者群分けは入院時の診断をもとに行うが、入院後に重症⇒軽症に軽快した患者、軽症⇒重症に増悪した患者については、病態変化時点での検体をそれぞれ軽症群、重症群に組み入れる。なお、重症・軽症の定義は、Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines (NIH) に従う。

2)同一患者内の経時的比較として、重症⇒軽症⇒治癒（退院前）の各段階での抗原を比較する。

この実験でのウイルス抗原の同定は LC-MS/MS 解析とデータベース検索で行う。具体的には、得られた MS/MS スペクトルを ViralZone または Uniprot に記載されているタンパク質データベースと照合し、体内で抗体と結合し免疫複合体を形成しているウイルスタンパク質を一斉同定する。SARS-CoV-2 については、登録タンパク質情報が随時更新されている状況であることを考慮し、他のコロナ型ウイルス (HCoV-229E、

HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1) タンパク質データベースと混合したものを利用することで偽陽性を可能な限り排除する。また、抗体の交叉反応性を考慮し、定期および任意予防接種対象病原体（結核、日本脳炎、インフルエンザなど）も検索データベースに含める。

2022 年度共同研究費で計画する内容は以下の通り。

目的抗原量の測定

目的抗原の **unique** 配列（SARS-CoV-2 以外の病原体や宿主が持たないアミノ酸配列）を LC-MS/MS で選択的に測定する。得られた定量値について、重症・軽症患者間の比較、重症⇒軽症または軽症⇒重症での前後比較を行い、相関性を確認する。

目的抗原のエピトープ特定

捕集した免疫複合体に含まれる目的抗原と抗体が最も近接する部分（エピトープとパラトープ間の距離が炭素鎖 10 個程度の距離）を架橋剤で共有結合する。これをトリプシンで酵素消化し LC-MS/MS 解析で MS/MS スペクトルを得る。得られたスペクトルを専用ソフトと人工知能搭載の高性能 PC で計算処理し、エピトープ配列を解読する。

③ 予想される成果

新型コロナウイルス感染症の治癒患者や軽症患者には、何らかの中和抗体が存在する可能性がある一方で、抗体が主体となる液性免疫が重症化に関与する可能性が指摘されている。抗体が結合するウイルス由来抗原を治癒患者や重症患者で特定すれば、これがワクチン開発ならび重症患者の治療法開発の研究標的になる。

新型コロナウイルス感染症の今後の更なる拡大と遷延が予想される。本研究では予防・治療研究で重要となる治癒患者や重症患者の抗体免疫の標的抗原とそのエピトープを *in vivo* 解析で正確に特定できる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

目的抗原量の測定

目的抗原の **unique** 配列（SARS-CoV-2 以外の病原体や宿主が持たないアミノ酸配列）を LC-MS/MS で選択的に測定し、重症・軽症患者間の比較、重症⇒軽症または軽症⇒重症での前後比較を試みた。また、質量分析装置の解析 PC に実装されているラベルフリー定量ソフトを利用し、目的抗原の量的比較が上記の組合せで可能かを調べた。

免疫複合体量の測定

免疫学的手法を使い、免疫複合体総量を測定した。具体的には、免疫複合体と結合する C1q（補体因子）を固相プレートに固定化し、結合した免疫複合体を二次抗体で検出する方法、補体が結合した免疫複合体と親和性が高い C3d 抗体を固相プレートに固定化し同様の方法で検出する方法の2つで実施した。

② 成果（結果＋考察）

目的抗原量の測定

目的抗原に特有の **unique** ペプチドを選択的に検出するのに必要なフラグメントイオンの強度が弱く、定量データを得ることができなかった。十分な強度が得られなかった原因はイオン化効率の悪さが考えられるが、昨年度に実施した網羅的解析では同定されており、矛盾が考えられる。一方、質量分析装置のハード面での劣化で昨年度より感度が低下した可能性も考えられた。短期間での問題解決には至らないと判断し、代替実験として免疫複合体量での比較を行った。

免疫複合体量の測定

免疫複合体量については重症・非重症患者間を上記の2種類の方法で得た定量結果をもとに比較した。C1q法とC3d抗体法のいずれでも、重症・非重症患者の間に統計学的に有意な差はなかったが、重症群で少ない傾向が認められた。重症群で免疫複合体が組織沈着し、結果的に体内を循環する免疫複合体総量が低下した可能性が考えられたが、症例数を増やして検証する必要がある。

③ 成果の公表

国際学術雑誌に論文投稿する予定である。

6. 自己評価

本年度は当初予定した目的抗原量の測定で合目的の実験データが得られなかった。代替実験とした免疫複合体量の比較で免疫複合体の病的意義を考察することができたことは有意義であった。また、代表者の都合で一時研究を中断せざるを得ない状況があり、研究の進捗が想定外に遅れた。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

2022 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : **Evaluation of humoral immune response induced by SARS-CoV-2 natural infection and vaccine, and identification of severe COVID-19 predictors**

Project number : **2022 – Ippan – 26**

2 . Principal investigator : Shyam Prakash Dumre, PhD, Associate Professor, Central Department of Microbiology, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal

Joint researcher(s) : Professor Kouichi Morita, and Mya Myat Ngwe Tun, Associate Professor, Department of Virology, NEKKEN

3 . Amount decided : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has spread throughout the world and infected over 100 million individuals resulting in over two million deaths (WHO Weekly Epidemiological updates, Jan 2022; WHO, 2022). One year in the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, the first vaccines are being rolled out in many countries under emergency use authorizations while >60 vaccines are in trials (WHO COVID-19 vaccine landscape, 2022). As of 4 January 2022, a total of 9,118,223,397 vaccine doses have been administered globally. While the whole world is optimistic on the role of vaccines in ending the pandemic, rapidly evolving newer variants of SARS-CoV-2 are becoming another challenge due to its faster spread, and potential role in protective efficacy of vaccines. SARS-CoV-2 may mutate and evade immunity, with consequences for efficacy of emerging vaccines and antibody therapeutics (Thomson et al., Cell, 22 Jan 2021).

Most individuals after SARS-CoV-2 infection develop neutralizing antibodies that target spike protein, however there are currently limited data on the dynamics of neutralizing antibodies in the months after infection (Crawford et al, J Infect Dis, 30 Sep 2020). On average, neutralizing titers decreased about 4-fold from approximately 30 to >90 days after symptom onset in US population. Moreover, despite the rapidly rolled -out COVID-19 vaccines in many countries, humoral immune response data is not available in the same race (not even for the natural infections). The available data are mostly from the well-resourced countries while the immune response (either due to

natural infection or vaccination) may not be the same in all populations/ countries. Low and middle income countries (LMICs) which already overburdened the health care system and are struggling for equitable allocation of limited resources to contain the virus spread. Generating such data to monitor the introduction of new variants and their impacts in transmission, adaptability and in vaccine is becoming a hard-to-achieve goal for most LMICs, due to lack of advance facilities for humoral response evaluation. Nepal is no exception.

After the first report of COVID-19 on 23 January 2020, Nepal recorded a total 950,441 cases and 11,735 deaths (fatality rate, 0.75%) with 98.6% recovery rate as of 30 January 2022. Nepal is among the few countries which flattened the COVID-19 curve with daily cases brought down to 150-300 from approximately 6000 cases during the last peak, however the pandemic is on full swing of third wave in the country (Ministry of Health, Nepal: <https://covid19.mohp.gov.np/>). End of January 2021, Nepal also started vaccinating the front-line workers followed by elderly, adults and currently in children population too, while the adequate vaccine coverage is still a challenge as in other LMICs. As of 30 January 2022, 51% of the Nepalese population has received at least one dose and 38% population has received full doses (Ministry of Health, Nepal, 2022). Furthermore, the recent introduction of new Omicron variant in Nepal also poses added challenges for the prevention of second wave. Because, it is of great concern that these newly emerging variants may escape neutralizing antibodies induced by previous infection and/or vaccination through mutations in the spike protein (Jangra et al., MedRxiv, January 29 2021, doi: 10.1101/2021.01.26.21250543). Unfortunately, no data is available on neutralizing antibody levels in Nepali population after natural infection or vaccination. At this situation, it is important to remain extra vigilant about collecting adequate immune response data from both vaccines as well as SARS-CoV-2 infected individuals to inform scientific community as we as to ensure appropriate policy and strategies, since a second wave may appear at any point of time, disrupting the already weakened health systems.

While looking at the kinetics of the neutralizing antibody in natural SARS-CoV-2 infection among the hospital visiting patients, it is an excellent idea to look at the factors responsible for severe COVID-19 (predictors) as we recruit and precisely follow up the patients. A high proportion of COVID-19 patients admitted to ICU cases suggest comorbidities including hypertension, diabetes, obesity, chronic obstructive pulmonary

disease (COPD), asthma, cardiovascular diseases (CVD), liver diseases, malignancy, human immunodeficiency viruses (HIV) and renal diseases as potential risk factors for severe COVID-19 patients (Wang et al., 2020a). There have been some investigations on other laboratory and immunological parameters to understand the risk factors of severity in COVID-19. It has been found that the Lymphocyte count, hemoglobin, and ferritin levels were the best prognostic indicators of severe COVID-19 (Qu et al., 2021). Apoptosis is believed to be the major source of cfDNA in plasma (van der Vaart and Pretorius, 2008), although the exact mechanism of its generation is still enigmatic (Phuong et al., 2019). The association between apoptosis and COVID-19 severity has been reported (Saleh et al., 2020). cfDNA, could be a new approach in severe COVID-19 predictor studies. Considerable progress has been made in COVID-19 management, however the lack of appropriate predictors of severity has caused failure for early identification of potential severe cases. In the case of Nepal, no such data is available. Without proper measurement of severity, there is poor management of the disease. Therefore, we have extended the study objectives to cover the predictors of severe COVID-19 too.

Therefore, in this study, we aim to evaluate:

- 1- the humoral immune response induced by SARS-CoV-2 natural infection and vaccine by quantifying both the neutralizing and binding antibody levels in Nepali population.
2. the association between the cell free DNA, laboratory parameters, other immune markers levels with the COVID-19 severity (potential predictors of severe COVID-19)

(2) Research content

Research details

This study is related to the work/ studies done at NEKKEN and particularly at the Department of Virology, where similar studies have been conducted in other viral diseases (JE, dengue, Zika, etc.) for years now. Moreover, the PI (SPD) spent around 5 years at NEKKEN as an Assistant Professor and worked in collaboration with the Virology Department, and recently returned to Nepal. PI has been involved in several COVID-19 related projects in the country and this research support would be a milestone to establish a continued and sustainable collaboration of NEKKEN-alumni with NEKKEN for future research activities. On top of it, this will be a collaborative research support to a developing country in the fight against COVID-19 pandemic from NEKKEN.

Study design and study sites

This will be a prospective cohort study to evaluate the humoral immune response, and a cross-sectional approach will be used for COVID-19 severity predictors. Two tertiary care hospitals and a research laboratory have been selected as sentinel sites. Gangalal Hospital and Sukraraj Tropical and Infectious Diseases Hospital located in Kathmandu are two of big tertiary care hospitals in Nepal which are designated for COVID-19 treatment and are also COVID-19 vaccination centers. Some of the natural infection related work will also be carried out in the Decode Genomics and Research Center Pvt. Ltd is a Molecular Diagnostic Laboratory dedicated to providing molecular **diagnostic** services to hospitals across Kathmandu. The another site is a community in Dhanusha district in southern terai region of Nepal specially selected for vaccine induced immunity. Dhanusha district has a mixed population of two different ethnic groups. Study site selection is also based on other criteria, including catchment area, geographical representation, communication facilities, infrastructure and human resources available for the study.

Study population

There will be two groups of target population. There is no gender, race and ethnicity restrictions for inclusion.

- Group 1: SARS-CoV-2 infected individuals (confirmed by real-time RT-PCR) to assess the humoral immunity induced by natural infection.
- Group 2: Prospective COVID-19 vaccinees who visit the vaccination center for the first dose of COVID-19 vaccine (COVISHIELD*) to assess the vaccine induced humoral immunity

*ChAdOx1_nCoV-19 Corona Virus Vaccine (Recombinant) developed by Oxford/AstraZeneca and produced by Serum Institute India, (for adults) and Pfizer–BioNTech COVID-19 vaccine (for children (12-17 years old)

Group 3: Severe and mild COVID-19 patients admitted to the sentinel hospital (and healthy adults as controls)

Exclusion criteria

The following individuals will be excluded from the study

- History of underlying immunocompromised conditions or autoimmune diseases: These people may have altered humoral immune response and can have impacts on evaluation

- Prior episodes of SARS-CoV-2 infection
- SARS-CoV-2 sero-positive status for vaccine group
- Not agreed for voluntary participation and do not adhere to follow ups

Sample size and participant recruitment

A total 439 individuals (113 participants from natural infection and each vaccination groups; and 100 for predictor group) will be enrolled in the study. Individuals will be recruited from both hospitals/lab and community until the target sample size is achieved. After taking the informed consent from study participant, he/she will be enrolled as study participant. A questionnaire will be administered to collect sociodemographic information followed by a request for blood collection at the laboratory. Additionally, data will also be archived from medical records (clinical/ laboratory details)/ vaccination card.

Sampling time-frame, sample collection and follow up

Enrollment started in 2021 and will continue till August 2022. Participant will be followed up for 6 months (20% loss to follow up expected).

- For the vaccine group, blood samples will be collected from each participant at 4 different time-points (before COVID-19 vaccination (baseline), 1 month, 3 months and 6-months post-vaccination).
- For the natural infection group, blood samples will be collected from PCR positive individual (at diagnosis, 1 month, 3 months and 6-months post-infection (diagnosis)).
- For the predictor study, sample will be collected once at the time of the first hospital visit.

For each visit (each time point), 3-5 ml (2-3 ml for child) of venous blood will be collected from the study participant and allowed to clot for serum separation. Serum will be aliquoted. transferred to CDM, TU laboratory and stored at -80°C . One aliquot will be used to quantify anti-SARS-CoV-2 IgG antibody by ELISA while the rest aliquots will be stored at -80°C freezers to be shipped to Virology Department, NEKKEN, Nagasaki University, Japan for neutralizing antibody titers and cytokine measurements.

Specimen shipping to Japan

Serum samples will be transported to NEKKEN in a triple packaging system

maintaining the cold chain by commercial shipping agency. These sera upon receipt at Virology-NEKKEN will be stored at -80°C until assayed for neutralizing antibody titers.

Neutralization assay

Sampled received at the department of virology will undergo neutralization assay. Each serum sample will be 2-fold serially diluted in culture medium with the first dilution of 1:10 (dilution range of 1:10 to 1:2,560). Serum dilutions will be incubated with virus particles (SARS-CoV-2), and infected to Vero cells to determine the neutralization titers. Neutralizing antibody titer of the serum samples will be assessed against the different variants of SARS-CoV-2 (including Delta and Omicron).

Predictor identification

cfDNA will be quantified by SYBR Green double stranded DNA estimation as described previously (Phuong et al., 2019). Other immune and laboratory parameters including routine lab analysis will be performed as per the standard operating procedure according the National Guidelines of National Public Health Laboratory, Nepal (NPHL, 2020).

Data management and analysis

Data management will be the primary responsibility of the principle investigator (PI) in Nepal in cooperation with NEKKEN investigators. Standard data collection tools will be employed with the provision of unique ID (Code) for each study participant. Furthermore, regular supervision/monitoring/orientation visits to the sentinel sites will ensure quality data from the very beginning.

IBM SPSS version 21 and GraphPad Prism version 9 will be used for data analysis. Wilcoxon matched-pairs signed rank test or Mann-Whitney-U test will be used as appropriate to assess the difference in geometric mean antibody titers (95% confidence intervals) between the groups, while chi-square test will be used for categorical variables. Also, correlation between the ELISA antibody titres and neutralizing antibody will be assessed. A regression analysis will be done to explore the potential predictors of COVID-19 severity.

Ethical approval and informed consent

Ethical approval will be obtained from Institutional Review Committee, Institute of Science and Technology (IRC-IoST), Tribhuvan University, Nepal and Ethics Review Committee (ERC) at NEKKEN. Written informed consent will be obtained from each study participant according to the WHO-ERC guidelines for the informed consent process. Routine management, when needed, will be according to the “*Guidelines for Management of COVID-19 in Nepal*” developed by Government at these hospitals. This will be according to normal routine practice and neither influenced by the study nor supported by this study.

(3) Expected results

- a) Information obtained on humoral immune response (neutralizing antibody) due to SARS-CoV-2 infection in Nepali population.
- b) Humoral immune response (neutralizing antibody) induced by the COVID-19 vaccine (e.g. COVISHIELD) in Nepali adult population will be uncovered.
- c) Humoral immune response (neutralizing antibody) induced by the COVID-19 vaccine (e.g. Pfizer) in Nepali child population will be uncovered.
- d) Correlation between SARS-CoV-2 specific IgG antibody titre and neutralizing antibody titre (if ELISA can be a proxy of neutralizing antibody assay in resource-limited settings).
- e) Any association between socio-demographic/ clinical/ laboratory features and neutralizing antibody levels.
- f) Association between cfDNA, immune parameters, laboratory and clinical parameters with COVID-19 severity will be understood and potential predictors of severe COVID-19 will be identified.
- g) These information help, at large, to the scientific community and also to the government for evidence based policy and strategy making for vaccination as well as disease control, and timely clinical management during the third wave.

5 . Implementation report* :

(1) Research materials, methods, procedures (as implemented)*

This section is written according to the exact procedures/ methods followed as there have been some changes in the protocol compared to the first submitted proposal.

Study design and study sites

This was a prospective cohort study to evaluate the humoral immune response (immunity) of COVID-19 vaccination in Nepali population at community level. One component (arm) of the study was a hospital based and cross-sectional in nature to evaluate the humoral immunity of natural SARS-CoV-2 infection and explore the predictors of severe COVID-19. Therefore, this study had the following three study sites- one in the community and two tertiary care hospitals (Figure 3)*:

1. COVID-19 vaccine study: Province-2, Mithila municipality, Dhanusha
2. SARS-CoV-2 natural infection study: Province-3, Gangalal Hospital, Bansbari, and Sukraraj Tropical and Infectious Diseases Hospital, Teku, Kathmandu, Nepal

*There was change in the study sites (n=2) compared to the initially proposed sites (n=3). This modification was made looking at the practical feasibility while executing the project particularly to have adequate number of severe COVID-19 cases. Study site selection was based on geographical representation, communication facilities, laboratory infrastructure, ultra-low freezer facility and human resources available for the study.

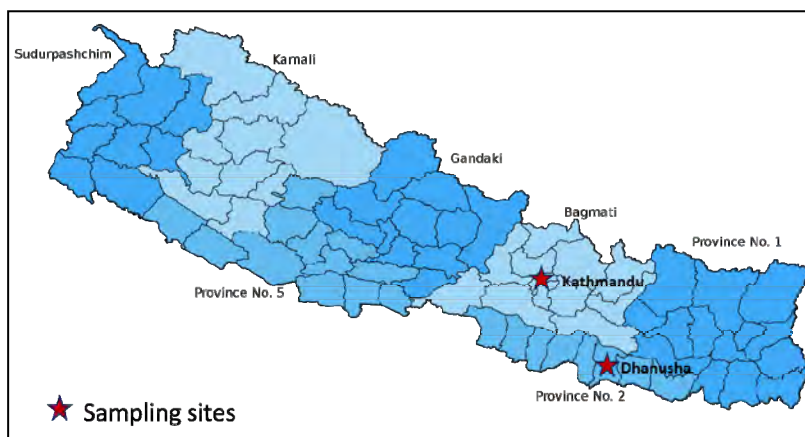


Figure 1. Map of Nepal showing the study sites.

Study population and sample size

There were two groups of target populations. There was no gender, race and ethnicity restrictions for inclusion.

Group 1 (n=225): Prospective COVID-19 vaccinees (children) who visited the vaccination center (school) for the first dose of mRNA based COVID-19 vaccine called Spvax (Moderna) to assess the vaccine induced humoral immunity

Group 2 (n=198): SARS-CoV-2 infected individual (RT-PCR positive) of any age with different severity levels (including 49 severe COVID-19 cases) to assess the neutralizing antibody (humoral immunity) and factors of COVID-19 severity

Sample size and participant recruitment

A total 198 COVID-19 patients for natural infection group and 225 individuals from vaccination groups were enrolled in the study. Individuals were recruited from the hospital and community (schools) in parallel until the target sample size was achieved for both arms. After taking the informed consent/assent from study participant, he/she was enrolled as a study participant. A questionnaire was administered to collect sociodemographic information followed by a request for blood collection. Additionally, data were also archived from medical records (laboratory parameters, clinical details, etc.)/ vaccination card.

Sampling strategy (Sampling time-frame, sample collection and follow up)

Vaccine group: Blood samples were collected from each participant aged 12-17 years at 4 different time-points (before COVID-19 vaccination (baseline), 1 month, 3-months and 6-months post-vaccination). Only those participants who had no previous COVID-19 vaccination records other than that of Moderna mRNA COVID-19 vaccine.

Natural infection group: Blood samples were collected from RT-PCR positive individuals of any age/sex at the time of hospital visit/admission who agreed for voluntary participation.

Exclusion criteria

1. History of underlying immune-compromised conditions or autoimmune diseases: These people may have altered humoral immune response and can have impacts/influence on evaluation.
2. Prior episode of SARS-CoV-2 infection.

Specimen collection, shipping, storage and analysis at CDMi, TU

For each visit (each time point), 5 mL (3mL from children) of venous blood was collected from the study participant and allowed to clot for serum separation which was aliquoted into cryovials (3 aliquots), transiently stored at -80°C freezers at sentinel hospitals or at community (until transported) and transferred to CDMi, TU laboratory). One aliquot was used to quantify anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody by competitive ELISA while the rest aliquots were stored at -80°C freezers until shipped to NEKKEN. One aliquot of each sample was retained at CDMi laboratory as a backup plan.

For the natural infection group, the laboratory analysis has been complete except the cell-free DNA estimation, which will require another one month.

Estimation of SARS CoV-2 neutralizing antibody levels

The competitive inhibition enzyme immunoassay technique was utilized in estimating neutralizing antibodies against SARS-CoV-2. The manufacturer's protocol (Cusabio, USA) was followed to ensure a high degree of accuracy during the testing process.

Calculation and Interpretation of the result: After collecting ELISA data, the binding rate was calculated and IC_{50} was obtained by plotting standard concentration and corresponding percentage binding rate as the x-axis and y-axis, respectively. A graph was also created by plotting the OD of the standard on the X-axis and its log concentration on the Y-axis. The log concentration of the unknown samples was calculated by interpolating second-degree polynomial equation, which subsequently converted into $\mu\text{g/mL}$.

$$\text{Binding rate (\%)} = B/B_0 \times 100\%$$

Where, B= the average absorbance value of the sample or Standard

B_0 = the average absorbance value of the 0 ng/ml (0 nM)

second-degree polynomial equation,

$$y = 1.7881x^2 - 4.9767x + 3.6329$$

Evaluation of binding IgG against SARS-CoV-2 spike protein

The evaluation of human IgG binding was performed using a solid phase ELISA coated with the full-length spike protein. The assay protocol adhered strictly to the manufacturer's recommendations (Cell Signaling Technology, USA).

The average absorbance of the positive and negative controls was calculated, and subsequently, the P/N ratio was determined for each sample. A P/N ratio of >3 was

regarded as positive, while a P/N ratio of <3 was regarded as negative.

Specimen shipment and analysis at NEKKEN virology

One aliquot was shipped to Virology Department, NEKKEN, Nagasaki University, Japan for confirmatory estimation of IgG antibodies against SARS-CoV-2 Spike protein by ELISA (SARS-CoV-2 Spike IgG ELISA, Shimane University) and confirmatory assay for virus neutralizing antibodies by using cell-culture based method (PRNT). This neutralizing assay was to evaluate neutralizing ability against different variants of SARS-CoV-2 (Wuhan, Delta, Omicron). This work at Virology NEKKEN is ongoing now for the 6-months follow up samples while pre-, 1- and 3- months post-vaccination sample analysis were completed. The joint team at NEKKEN-Virology has been supporting on this part.

Data management and analysis

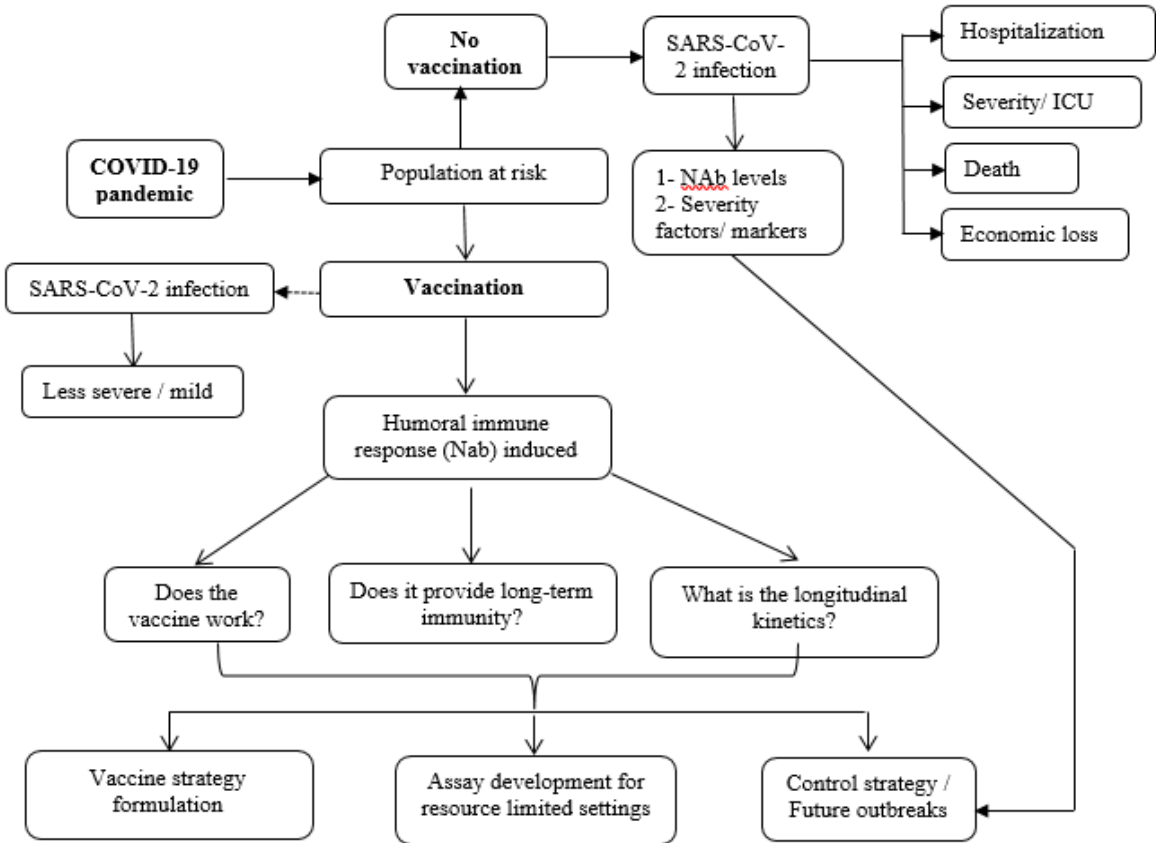
Data management is the primary responsibility of the principle investigator (PI). Standard data collection tools were employed with the provision of unique ID (code) for each study participant (both study arms). All the data on patients' clinical and laboratory parameters were transcribed into the spreadsheet (MS Excel), and appropriate data verification and cleaning were done (except cfDNA). Furthermore, regular supervision/ monitoring/ orientation visits to the sentinel sites ensured quality data from the very beginning.

SPSS for Windows, version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY) and GraphPad Prism version 9 were used for data analysis. Categorical variables were presented as absolute number (n) and percentage (%) as appropriate. Wilcoxon matched-pairs signed rank test or Mann-Whitney-U test of Kruskal Walling test was used as appropriate to assess the difference in geometric mean antibody titers (95% confidence intervals- CI) between the groups, while chi-square (or Fisher's exact) test was (partly) used for categorical variables. Regression analysis will be used to identify the COVID-19 severity predictors (including cfDNA). Spearman's rank correlation was used to assess the correlation between binding IgG and neutralizing antibody levels. p value less than 0.05 has been considered statistically significant.

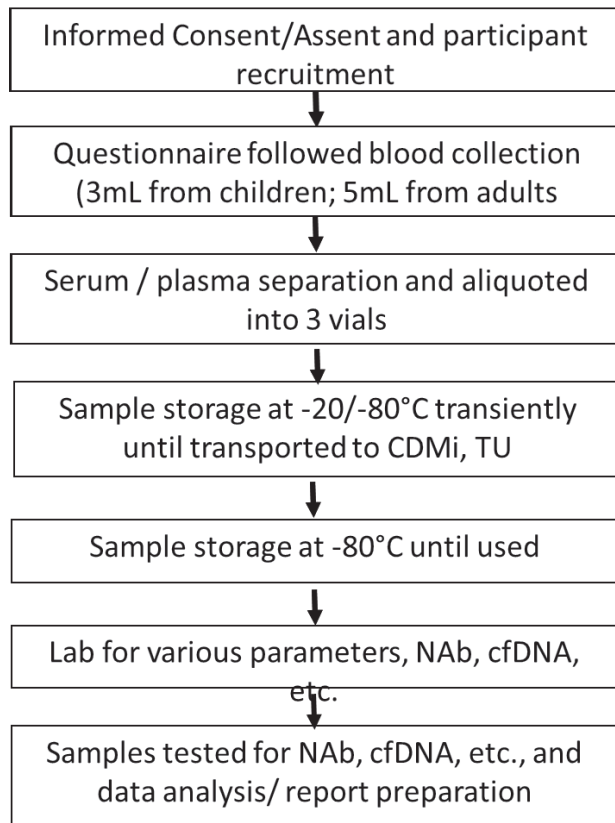
Ethical approval and informed consent

Ethical approval for this study was obtained from Institutional Review Committee (IRC)-IoST, TU, and Nepal Health Research Council (NHRC), Government of Nepal. Written informed consent was obtained from each study participant according to the WHO-ERC guidelines for the informed consent process. Routine management at hospital, when needed, was according to the “*Guidelines for Management of COVID-19 in Nepal*” developed by Government, and was not the responsibility of the study team. This was according to the normal routine practice and neither influenced by the study nor supported by this study.

Conceptual framework and methodological flow-chart



Conceptual framework



Overall flow diagram of the study.

(2) Results (results & observations)

A. Findings of the COVID-19 vaccine study

In this study, blood samples from 225 participants was initially collected prior to vaccine administration, with successful follow-up and sampling of 202 participants during the 1-month post vaccination. Subsequently, 191 participants were followed-up for sample collection during the third month post 1st dose. And, 147 participants completed all 3 follow ups including 6-months post-vaccination sampling.

Notably, 10.22% of participants (n=23) were lost to follow-up during the first month, while 15.11% of participants (n=34) were lost to follow-up during the third month.

Gender, age and body mass index (BMI) profiles of study participants

Among 225 participants, 95 (42%) were female and 130 (58%) were male (Figure 2).

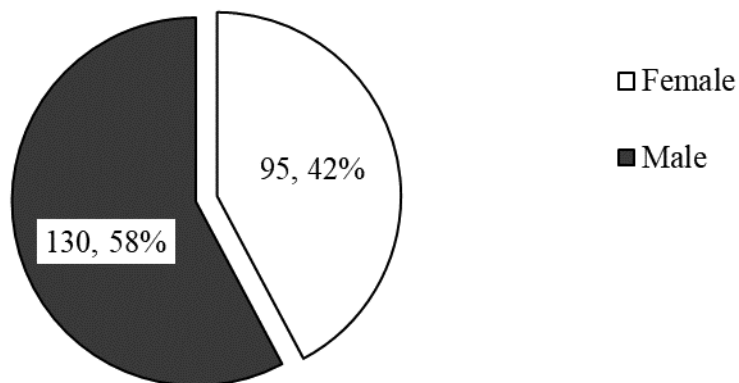


Figure 2. Gender distribution of study participants

The age of the participants ranges from 13 years to 17 years (Table 1). The maximum number 83 (36.9%) were from 17 years of age followed by 69 (30.7%) from 16 years, 48 (21.3%) from 15 years, 20 (8.9%) from 14 years and 5 (2.2%) from 13 years of age. The median age of the participants was 16 (15-17 years) with a range of 13-17 years.

Table 1. Age distribution of participants

Age	Number (%)
13	5 (2.2)
14	20 (8.9)
15	48 (21.3)
16	69 (30.7)
17	83 (36.9)
Total	225 (100)

The median BMI of the study participants was 20.5 (19.3-22.2) with a range of 15.9-38.3 (Figure 2).

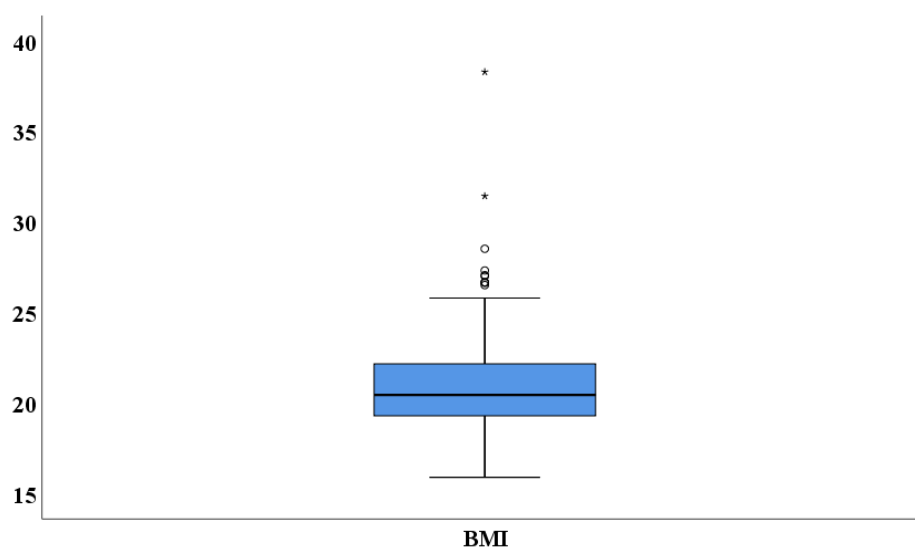


Figure 2. BMI profile of study participants

Ethnic distribution of study participants

The data on ethnic distribution of the participants showed highest number of Madhesi (75.1%) followed by Janajati (14.2%) and so on (Table 2).

Table 2. Ethnic distribution of participants

Ethnicity	Number (%)
Brahmin	12 (5.3)
Chhetri	5 (2.2)
Subtotal	17 (7.5)
Dalit	6 (2.7)
Janajati	32 (14.2)
Subtotal	38 (16.9)
Madhesi	169 (75.2)
Muslim	1 (0.4)
Subtotal	170 (75.6)
Total	225 (100)

Post vaccination follow-up and sampling

During the 1st follow-up, a total of 202 individuals were enrolled for sampling, with 23 participants lost to follow-up (Table 3). The reasons for the lost to follow-up were as follows: 16 participants were absent during the sampling process, 4 withdrew their

consent, and 3 were still unvaccinated. In the second follow-up, 191 participants were enrolled and samples were collected, with 34 participants lost to follow-up. Of the lost to follow-up participants, 26 participants were absent during the collection, 7 withdrew their consent, and 1 participant was still unvaccinated. Among the absentee participants, one had gotten married, while another withdrew due to weakness.

Table 3. Post vaccination follow-up and sampling

Status	First follow-up (%)	Second follow-up (%)
Absent	16 (7.1)	26 (11.6)
Consent withdrawn	4 (1.8)	7 (3.1)
Non-vaccinated	3 (1.3)	1 (0.4)
Subtotal of missing	23 (10.2)	34 (15.1)
Sampled	202 (89.8)	191 (84.9)
Total	225 (100)	225 (100)

Adverse events (AEs*) of Moderna mRNA vaccine in Nepali children

Of among all the participants, a total of 171 (85%) individuals reported adverse events following immunization after administration of 1st dose of Moderna vaccine. On the other hand, a total of 163 (85.3%) individuals reported adverse events after administration of 2nd dose.

There were no instances of serious adverse events recorded during the study period. However, the most frequently reported adverse event was pain at the injection site, with 165 (96.5%) events reported after the 1st dose and 125 (76.7%) events reported after the 2nd dose. The second most frequently reported adverse event was fever, with 50 (29.2%) events reported after the 1st dose and 92 (56.4%) events reported after the 2nd dose (Figure 3).

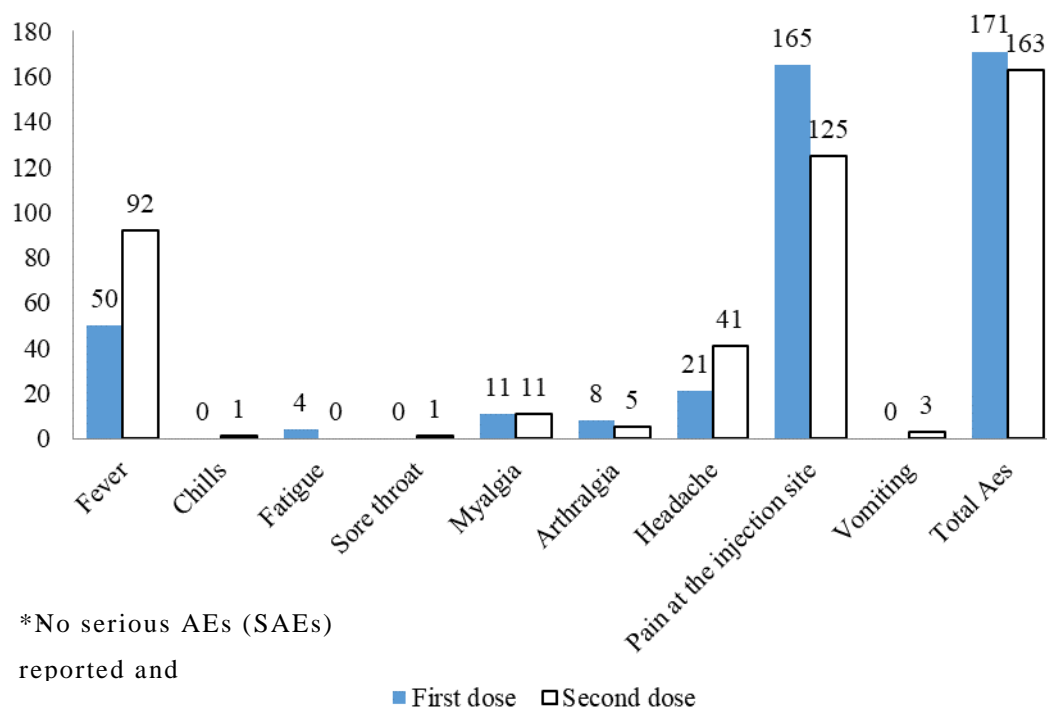


Figure 3. Adverse events of Moderna vaccine in Nepali children

Relationship of anti-spike IgG (P/N ratio) with NAb levels

A Spearman's rank correlation coefficient of 0.772 was observed between 1 month NAb and P/N value of IgG, indicating a strong positive correlation between these variables (Figure 4). This suggests that higher levels of IgG P/N value may be associated with higher levels of NAb at 1 month post-vaccination. This finding may have important implications for understanding the immune response to vaccination and may guide the development of future vaccination strategies. Further research is needed to confirm and expand upon these results.

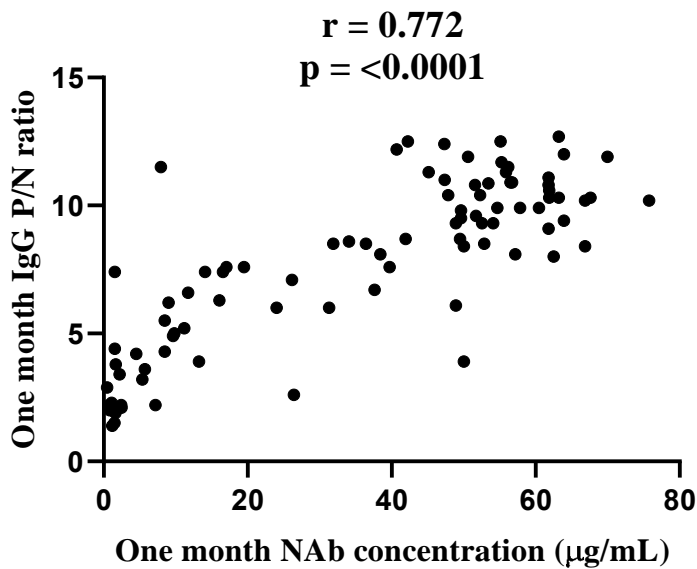


Figure 4. Scatterplot of anti-spike IgG (P/N ratio) and NAb levels

IC₅₀ values for NAb

The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was obtained by performing ELISA as directed by the manufacturer. The range of standard concentration used for its determination ranged from 0 to 125nM. The percentage binding rates of the standard were calculated using Excel and the Dose-response curve fit model (4PL) was used to calculate the IC₅₀. The IC₅₀ value for NAb against SARS-CoV-2 at 1 month post 1st dose was calculated as 0.3827nM (Figure 5). Similarly, the IC₅₀ values for NAb against SARS-CoV-2 at 3 months post 1st dose were calculated to be 0.1236nM (Figure 6).

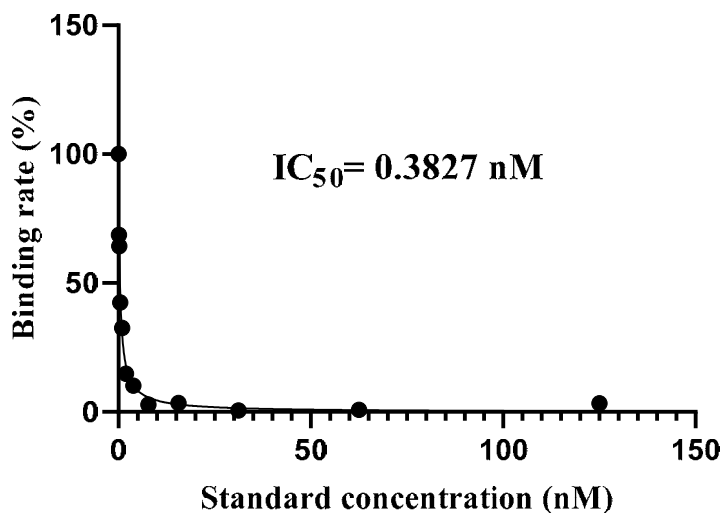


Figure 5. IC₅₀ values for NAb against SARS-CoV-2 at 1 month post 1st dose

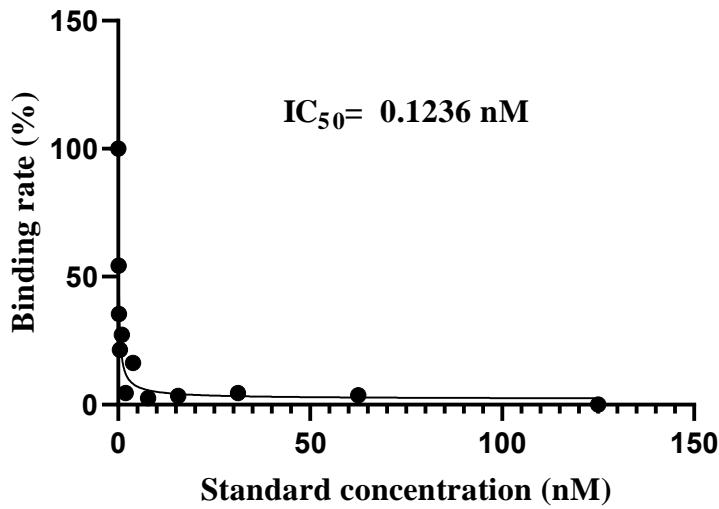


Figure 6. IC_{50} values for NAb against SARS-CoV-2 at 3 months post 1st dose

Kinetics of NAb concentration in study participants

The study found that the median NAb concentration among participants was 2.29 μ g/mL (1.3-5.6 μ g/mL) before vaccination, ranging from 0-40 μ g/mL. After one month of receiving the 1st dose, the median NAb concentration significantly increased to 50.87 μ g/mL (27.25-61.13 μ g/mL), within the range of 0-68 μ g/mL. Similarly, after three months from the 1st dose, the median NAb concentration further increased to 55.4 μ g/mL (42.9-64.43 μ g/mL), ranging from 33-111 μ g/mL (Figure 7).

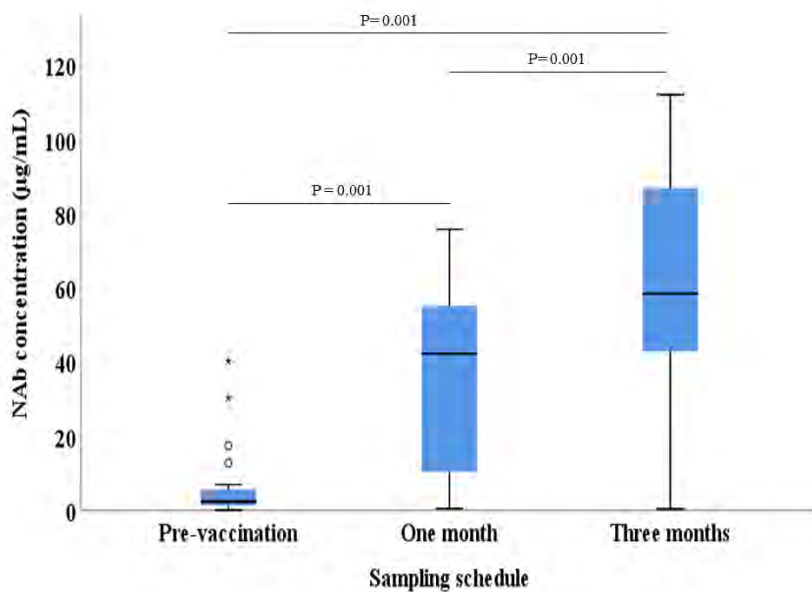


Figure 7. Kinetics of NAb concentration in participants. A p-value of 0.001 has been

calculated after employing Wilcoxon Signed Rank test.

Kinetics of NAb concentration in study participants by gender

The data shows that before vaccination, the median NAb concentration was higher in male participants (4.11µg/mL) (range 0-17) compared to female participants (1.71µg/mL) (range 0-40). After one month of vaccination, the median NAb concentration increased in both male (52.55µg/mL) (range 1-67) and female (47.86µg/mL) (0-68) participants, but was higher in male participants. At the end of the third month after vaccination, the median NAb concentration was higher in male participants (56.2µg/mL) (range 38-111) compared to female participants (55.13µg/mL) (range 33-111), but the difference was not as large as it was before vaccination (Figure 8).

After the application of the independent samples Mann-Whitney U test, we determined the p-values for pre-vaccination, 1 month, and 3 months NAb concentrations to be 0.503, 0.105, and 0.503, respectively, which exceeds the predetermined significance level of 0.05.

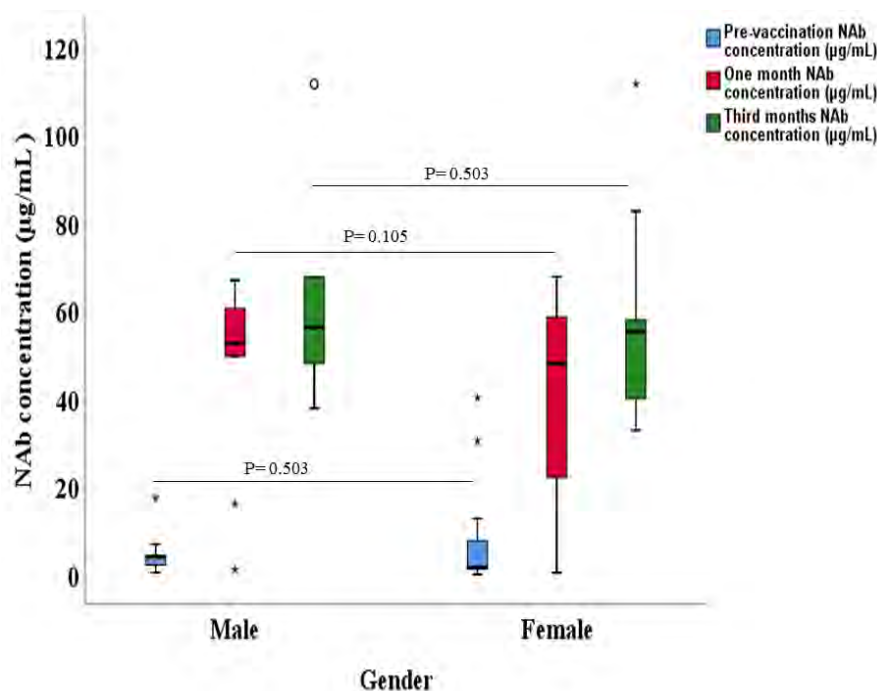


Figure 8. Kinetics of NAb concentration in participants by gender

Kinetics of NAb concentration in study participants by age groups

Before vaccination, the median NAb concentration was similar for both age groups, with 12-14 years old having a median of 2.41µg/mL (1.71-5.6µg/mL) and 15-17 years old were having a median of 2.28µg/mL (1.01-8.49µg/mL) within the range 0-40µg/mL and 0-30µg/mL, respectively (Figure 9).

After one month of vaccination, both age groups showed a substantial increase in the median NAb concentration. The 15-17 years old group had a slightly higher median NAb concentration than the 12-14 years old group, with medians of 53.61µg/mL (27.25-61.85µg/mL) and 48.94µg/mL (23.19-53.5µg/mL) within the range 0-68µg/mL and 2-67µg/mL, respectively.

By the end of the third month, the median NAb concentration continued to increase for both age groups. The 15-17 years old group still had a higher median NAb concentration than the 12-14 years old group, with medians of 56.75µg/mL (43.57-64.43µg/mL) and 51.56µg/mL (40-69.12µg/mL) within the range 33-111µg/mL and 37-111µg/mL, respectively.

Upon conducting the Mann-Whitney U test for independent samples, we obtained p-values of 0.734, 0.451, and 0.054 for Pre-vaccination, 1 month, and 3 months NAb concentrations, respectively. These values surpass the pre-established significance level of 0.05.

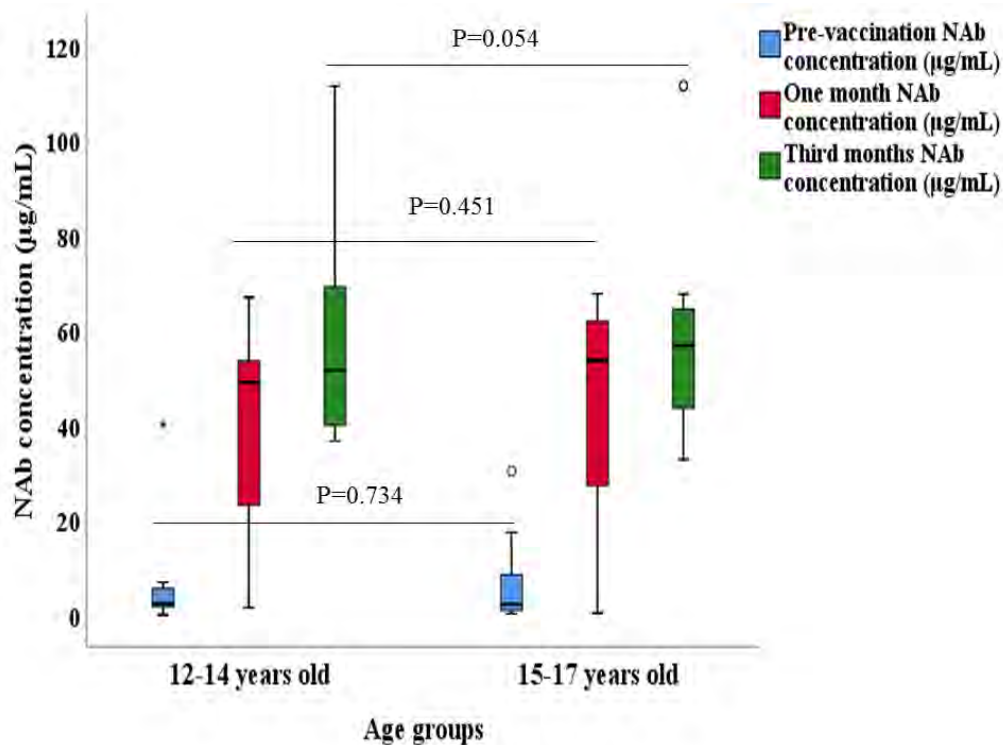


Figure 9. Kinetics of NAb concentration in participants by age groups

Dynamics of NAb concentration in study participants by body mass index (BMI)

Upon examination of pre-vaccination NAb concentrations for underweight, normal weight, and overweight participants, values were found to be 4.11 $\mu\text{g/mL}$ (2.91-17.22 $\mu\text{g/mL}$), 2.15 $\mu\text{g/mL}$ (1.1-4.26 $\mu\text{g/mL}$), and 4.3 $\mu\text{g/mL}$ (2.28-5.6 $\mu\text{g/mL}$), respectively, within the range of 0-20 $\mu\text{g/mL}$, 0-40 $\mu\text{g/mL}$, and 0-70 $\mu\text{g/mL}$. Following vaccination (Figure 10), NAb concentrations increased after one month to 16.05 $\mu\text{g/mL}$ (10.88-38.93 $\mu\text{g/mL}$), 51.29 $\mu\text{g/mL}$ (40.67-60.45 $\mu\text{g/mL}$), and 51.71 $\mu\text{g/mL}$ (26.08-59.3 $\mu\text{g/mL}$), respectively, within the range of 0-62 $\mu\text{g/mL}$, 1-68 $\mu\text{g/mL}$, and 0-67 $\mu\text{g/mL}$ for underweight, normal weight, and overweight participants. At the end of the third month, NAb concentrations further increased to 57.29 $\mu\text{g/mL}$ (56.21-59.27 $\mu\text{g/mL}$), 55.93 $\mu\text{g/mL}$ (43.57-82.57 $\mu\text{g/mL}$), and 37.76 $\mu\text{g/mL}$ (37.76-42.87 $\mu\text{g/mL}$), respectively, within the range of 55-61 $\mu\text{g/mL}$, 33-111 $\mu\text{g/mL}$, and 38-48 $\mu\text{g/mL}$ for underweight, normal weight, and overweight participants.

To determine if any significant association existed in NAb concentration and BMI categories, the Kruskal Wallis test was performed for independent samples. The results yielded p-values of 0.665, 0.023, and 0.430 for pre-vaccination, 1 month, and 3 months NAb concentrations, respectively.

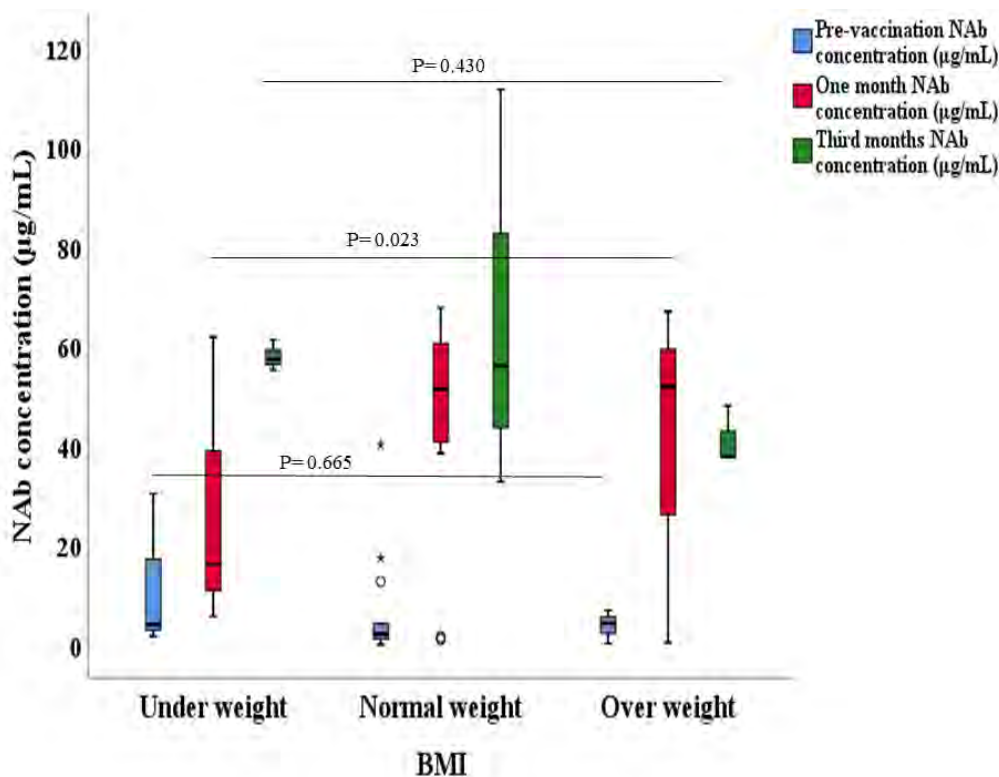


Figure 10. Dynamics of NAb concentration in participants by BMI

Dynamics of NAb concentration in study participants by ethnicity

The present study examined the ethnic distribution of NAb concentrations in response to vaccination. Results showed that all three ethnic groups (Chhetri, Madhesi, and Janajati) experienced an increase in NAb concentration after vaccination (Figure 11). Chhetri individuals had the highest pre-vaccination NAb concentration, with a median value of 21.41µg/mL within the range of 3-40µg/mL. They also had the highest NAb concentration at one month (median 44.27µg/mL, range 41-48µg/mL) and three months (median 97.01µg/mL, range 83-111µg/mL) after vaccination. In contrast, Madhesi individuals had the lowest pre-vaccination NAb concentration with a median value of 2.15µg/mL (range 0-30µg/mL), but showed the greatest increase in NAb concentration after vaccination, particularly at the one-month time point with a median antibody concentration of 52.13µg/mL within the range of 0-68µg/mL. Janajati individuals had intermediate pre-vaccination NAb concentrations (median 4.3µg/mL, range 2-7µg/mL) and showed a more modest increase in NAb concentration after vaccination, with a median value of 36.3µg/mL (range 6-67µg/mL) during the 1st month and 51.56µg/mL within the range of 48-55µg/mL during the third month.

The Kruskal Wallis Test showed, the p-values 0.342, 0.760, and 0.357 for pre-vaccination, one month, and three months, respectively.

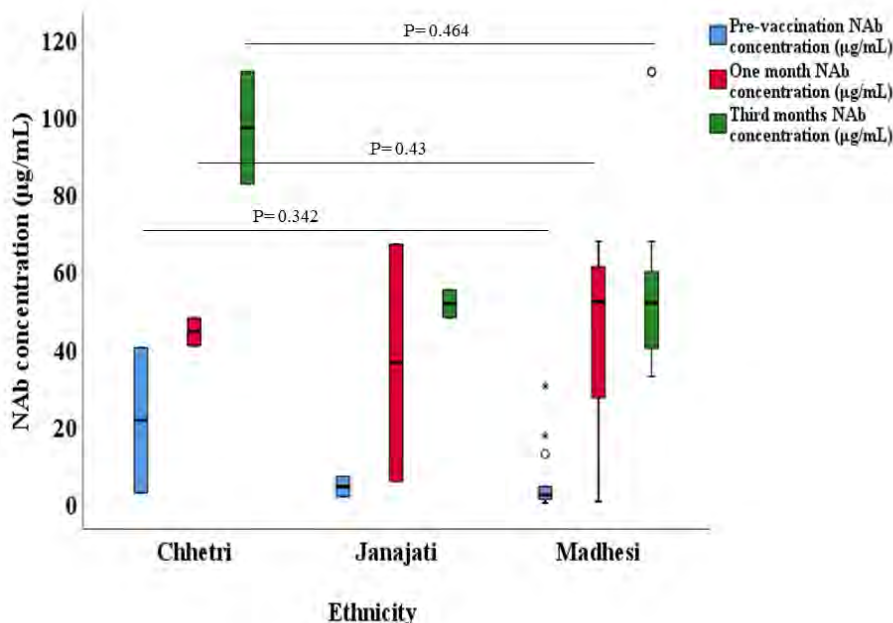


Figure 11. Dynamics of NAb concentration in participants by ethnicity

Protective efficacy of Moderna vaccine in Nepali children

From the information collected through questionnaire during sampling suggests that none of the participants were infected with SARS-CoV-2 (no testing had been done and they were not laboratory confirmed) during our study period. But they did report some recent COVID-19 like illness such as fever, cough, etc. (Figure 12). Upto 12-months flow results showed 4.5% after 1 month, 1% after 3 months, and 40% after 12 months post first dose reported COVID like illness indicating a gradual decline in protective efficacy of moderna vaccine.

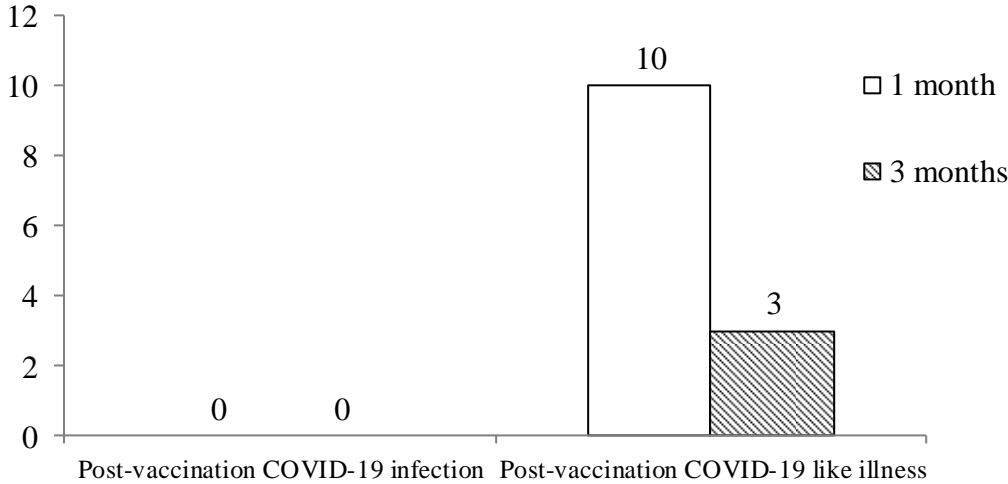


Figure 12. Protective efficacy of Moderna vaccine in Nepali children.

Analysis of neutralizing antibody by PRNT assay

Analysis of neutralizing antibody against Wuhan, Delta and Omicron variants of SARS-CoV-2 produced by moderna mRNA vaccine among Nepali children is being performed at NEKKEN virology and some preliminary results of few study participants (n=33) have been achieved. In the vaccinated people, the NT against China (Wuhan) variant was the highest with some cross-NT titers among Wuhan, Delta and Omicron variants (Figure 13).

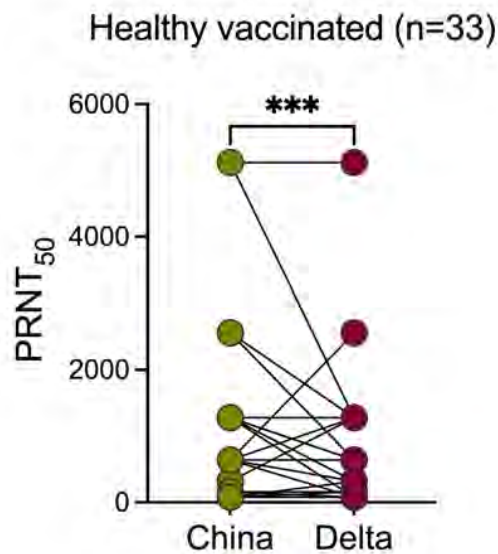


Figure 13. Neutralizing antibody titers in Nepali children vaccinated with moderna COVID-19 vaccine

B. Findings of the COVID-19 patient study

A total of 198 patients were enrolled and blood samples collected from two tertiary care hospitals in Kathmandu, Nepal. Of these, 73 samples (including those from 38 severe COVID-19 patients) were collected from Gangalal Hospital while Sukharaj Tropical and Infectious Diseases Hospital has 123 samples in total (including those from 49 severe COVID-19 patients). Altogether, we had 89 severe COVID-19 patients recruited.

Analysis of laboratory parameters

We have completed the following lab parameters- sugar, urea, creatinine, bilirubin, sodium, potassium, liver enzymes, D-dimer, CRP, CBC, ESR, etc., while cfDNA is being done (since the machine has recently calibrated and validated).

Analysis of neutralizing antibody by PRNT assay

Analysis of neutralizing antibody against Wuhan, Delta and Omicron variants of SARS-CoV-2 is being performed at NEKKEN virology and some preliminary results of few study participants (n=27) have been achieved. In the COVID-19 infected patients, the NT against Delta variant was the highest with some cross-NT titers among Wuhan, Delta and Omicron variants (Figure 14).

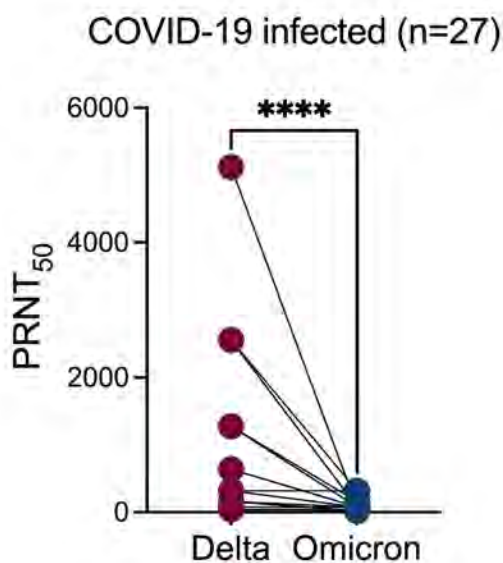


Figure 14. Neutralizing antibody titers in patients with natural SARS-CoV-2 infection determined by PRNT assay

Data analysis and manuscript drafting is currently ongoing for clinical and laboratory investigation of COVID-19 patients (natural infection arm).

(3) Announcement of results

Conclusions

We found a significant increase in neutralizing antibody (NAb) concentration in the participants from the non-vaccinated state to one month and three months post-vaccination. The median NAb concentration increased from 2.29 μ g/mL to 50.87 μ g/mL after one month and 55.4 μ g/mL after three months post the 1st dose, indicating that the vaccine has been inducing humoral immunity for the targeted child groups. The results of the statistical analysis indicate that gender, age, BMI, and ethnicity did not have a significant impact on the production of NAb. These findings suggest that the vaccine's biological efficacy can be obtained across various demographic groups. The main adverse event reported was pain at the injection site, with 165 (81.7%) and 125 (65.4%) events after 1st and 2nd dose, respectively. The second most reported adverse event was fever, with 50 (24.8%) and 92 (48.2%) participants reporting it post 1st dose and 2nd dose, respectively. Ten participants reported COVID-19-like symptoms after the 1st dose, and three participants reported such symptoms after the 2nd dose. Based on these findings, we can infer that the

vaccine demonstrated 95% efficacy after the 1st dose and 98% efficacy after the 2nd dose in preventing symptomatic infection from Omicron variants circulating at the time of study, as only a small proportion of participants reported COVID-19-like symptoms.

The PRNT showed that the NT pattern was different between SARS-CoV-2 natural infection and vaccination. NT against Delta variant was the highest among COVID-19 patients while it was Wuhan variant among the vaccinated individuals with some cross-NT titers among Wuhan, Delta and Omicron variants.

This finding yielded valuable data that can inform future planning and policymaking by the government when purchasing vaccines. The selective purchase of highly effective vaccines among the Nepali population can help save a significant amount of money that might have been wasted on less efficacious vaccines.

Deliverables (publications/ manuscripts)

1. Original Research article-1: Shrestha et al. Humoral immune response induced by COVID-19 vaccine among Nepali population. (final stage)
2. Review article: Shrestha et al. COVID-18 vaccines (final stage)
3. Original Research article-2: Kharel et al. Clinical and laboratory features of COVID-19 patients in Nepal. (Data analysis and drafting stage)

Special request

If possible, we request not to make the report public and remain private until end of August 2023 as we are yet to submit our research papers to peer-reviewed journals.

6 . Self-evaluation

Due to the mobility restriction (strict lockdown) and the vaccine shortage in the country, the project kick-off was delayed than expected. Therefore, for 2021, we were able to enroll pre-vaccinated children and follow up them for 1-month post vaccination. We were also able to recruit patients for natural infection. Despite this adverse situation, a total of 400 samples collected from the vaccine group (pre and post vaccination) and 100 from natural infection group. All the collected serum samples have been aliquoted and safely shipped (in cold condition) from the community/sentinel hospitals to the Central Department of Microbiology, Tribhuvan University (PI's home institution) and securely stored at -80C freezer.

Due to travel ban to Japan, PI could not visit Japan and bring NT assay kits purchased at NEKKEN. This also halted the shipping of specimens and only 200 samples could be delivered to NEKKEN virology for further analysis (100 each from vaccine and natural infection groups). NEKKEN virology is currently preparing for virus-culture based neutralization assay involving different variants, while we in Nepal are waiting for delivery of the NT kits from NEKKEN. Alternatively, PI is planning to visit NEKKEN with remaining samples and bring back the regents to Nepal.

Serum samples will be transported to NEKKEN in a triple packaging system maintaining the cold chain by commercial shipping or by PI. These sera upon receipt at Virology-NEKKEN will be stored at -80°C until assayed for neutralizing antibody titers.

In the new continued Joint Research proposal accepted, the PI will visit NEKKEN with all the samples (including 3-months post-vaccination) to analyze anti-spike protein IgG and Neutralizing antibodies soon against the new variants, like Delta and Omicron soon.

We recruited adequate participants in both groups (natural infection and vaccine arms), and collected blood samples including all follow ups for vaccine arm (pre-vaccination, 1-, 3- and 6-months post-vaccination follow ups). We also completed IgG and NT assays (ELISA) in Nepal and successfully shipped vaccine arm samples to NEKKEN virology for PRNT and ELISA validation. We also completed the lab analysis of natural infection samples for several parameters. Additionally, we also sent natural infection samples from both hospitals for natural infection arm) to NEKKEN for further analysis by ELISA and PRNT against different variants (Wuhan, Delta and Omicron). All the PRNT assays have been completed except the 6-months follow up (ongoing at NEKKEN-Virology now). The only remaining experimental part is cfDNA

assays which is planned for the next two months due to the machine validation tokk time. Nevertheless, we revealed the antibody titers after vaccine as well as natural infection in Nepali population and evaluated adverse events after Moderna vaccine and its protective efficacy in Nepali children. Despite the mobility restriction and lockdown and other issues like reagents shipment at cold condition from Japan, the amount of work completed and results obtained are of **full satisfaction** as per the PI's self-evaluation.

7. Attainment level

- I (Hardly any of the expected results were attained within the timeframe.)
- II (Although not with adequate satisfaction, a certain degree of results were attained.)
- III (The expected results were attained with full satisfaction) ***
- IV (Even better than expected results were attained)

***Explain your evaluation (Important Note)**

Due to lockdown, travel restriction, and cold-shipping issues of reagents from Japan to Nepal, we had to wait for long time for some of the laboratory results (COVID-19 natural infection group) most of which were completed and/or currently under data analysis and manuscript drafting stage. Data analysis and writing of the remaining part will be completed by next two months. All the laboratory work for vaccine group planned in Nepal has been completed while the sample analysis for 6-monhs post-vaccine follow up is being performed at NEKKEN virology lab for neutralizing antibody (PRNT) now.

Some glimpses of study



Photograph 1: Participants recruitment and blood sample collection, Mithila municipality, Dhanusha



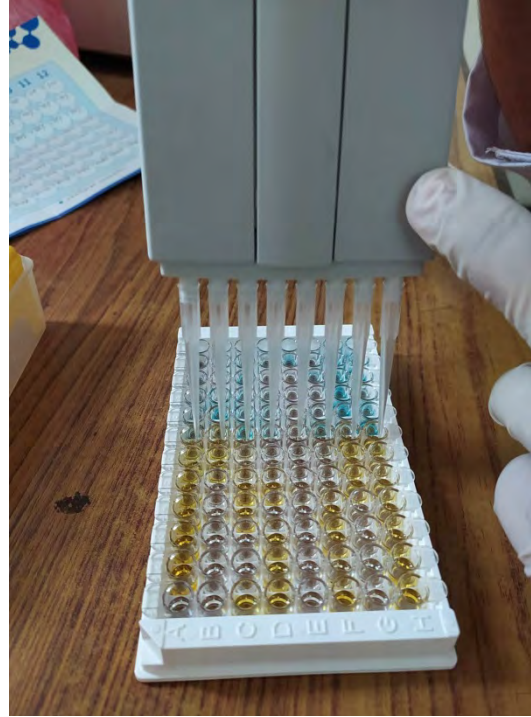
Photograph 2: Blood sample collected (before centrifugation)



Photograph 3: Serum preparation and aliquots in cryovials



Photograph 4: Transient sample storage at the local study site until transported to CDMi



Photographs 6/7: NT and IgG ELISA procedures

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：マラリア原虫メロゾイトの滑走運動に関わる分子の同定
課 題 番 号：2022-Ippan-27
2. 代 表 者：矢幡 一英(愛媛大学 PROS 寄生病原体学部門・准教授)
共 同 研 究 者：高島 英造(愛媛大学 PROS マラリア研究部門・准教授)
Ifra Hassan(愛媛大学 PROS マラリア研究部門・博士学生)
金子 修(長崎大学 熱帯医学研究所 原虫学分野・教授)
坂口 美亜子(長崎大学 熱帯医学研究所 共同研究室・助教)
3. 決 定 額：450 千円
4. 研究計画

① 研究目的

マラリア原虫を含むアピコンプレクサ原虫は、「滑走運動」と呼ばれるユニークな運動機構により宿主細胞・組織上を滑走した後、宿主細胞に侵入することが知られており、マラリア原虫はハマダラ蚊内では滑走運動することが知られていたが、宿主の赤血球侵入期において滑走運動することは知られていなかった。そこで我々は光学顕微鏡を駆使することにより、マラリア原虫が赤血球侵入の際に滑走運動している様子を撮影することに成功した[Yahata et al., 2021]。

滑走運動の推進力は、細胞外で宿主分子と接着した原虫分子が原虫細胞内でアクチン-ミオシン複合体からなる、アクトミオシンモーターに結合することにより生ずると考えられている。マラリア原虫は、媒介蚊内と宿主肝臓内におけるオオキネートとスポロゾイトが滑走運動をすることが古くから知られていたが、赤血球侵入期におけるマラリア原虫メロゾイトの滑走運動はこれまで見られなかったことから、メロゾイトは滑走運動を持たないと言われてきた。しかしながら、申請者は、マラリア原虫の赤血球侵入のタイムラプス解析 [Yahata et al., 2012]とカルシウムイメージング解析 [Pandey et al., 2016] を行う過程で、従来用いられてきた基質とは異なる基質を用いて、メロゾイトがトキシプラズマなど他のアピコンプレクサ原虫より遅いスピードで滑走運動を行なっていることを見出した [Yahata et al., 2021]。メロゾイトの滑走運動は感染赤血球放出後1分以内と短時間で見られ、これはメロゾイトの赤血球侵入能が感染赤血球放出後1分程度であることと一致したことから、見られた滑走運動能はメロゾイトの赤血球侵入能に深く関与していることが示唆された。滑走運動にはアクチンが関与するが、マラリア原虫の赤血球侵入期メロゾイトは生物の中でも短く、アクチン繊維が100nm以下であることが近年報告されている。このマラリア原虫特異的なアクチン繊維の長さやアクトミオシンモーターを構成するアクセサリタンパク質によりアクチン伸張の加減、さらにそれに繋がる滑走運動のスピードに関わっていると推測される。

マラリア原虫メロゾイトの赤血球侵入時には、メロゾイトが接着した直後に赤血球が著しく変形することが見られる。この間に原虫の赤血球侵入分子の活性化や赤血球膜構造の変化が起こっていることが示唆されている。赤血球変形はこれまでメロゾイト表面分子と赤血球表面分子が結合と分離を繰り返しているためと考えられていたが、分子レベルでの出来事はほとんど分かっておらず、観察されるダイナミックな変形の動きも分子間相互作用だけでは説明できなかった。申請者が見出したメロゾイト期マラリア原虫の滑走運動は、このダイナミックな赤血球変形をうまく説明できる。さらにマラリア原虫のアクトミオシン複合体のうち、アクチンや GAP45 分子をノックアウトしたところ、メロゾイトは滑走運動を示さず、さらに赤血球変形も起こさないことを見出した。さらに、一回膜貫通領域を持ち、赤血球侵入時にマラリア原虫と密着接合を形成する分子の一つである AMA1 は滑走運動と赤血球変形に関わらないことを示した[Yahata et al., 2021]。

マラリア原虫 スポロゾイトでは滑走運動に関わる分子として Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP)ファミリーが知られており、アピコンプレクサ原虫内で高度に保存されている。しかしながら、マラリア原虫メロゾイト期において発現する TRAP ファミリーの一つである MTRAP は赤血球侵入期には必須で無いことが報告されており、メロゾイトの滑走運動に関わる原虫分子は未だ同定出来ていない。

そこで本申請では、マラリア原虫メロゾイトの滑走運動に関わる分子を明らかにするため、マラリア原虫メロゾイト表面分子の組換えタンパク質より得られた抗体を用い、メロゾイト滑走運動および赤血球接着時のマラリア原虫分子を明らかにすることでマラリア克服のための新たな標的とシーズを創出する。

② 研究内容

マラリア原虫メロゾイトによる赤血球侵入初期に関わる滑走運動の役割を理解するため、(1)滑走運動に関わる分子の同定と(2)赤血球侵入との関連性を明らかにする。

1) 滑走運動に関わる分子の同定：滑走運動に関わる分子の抗体による検出、滑走運動に関わると予想される分子の薬剤誘導型コンディショナルノックアウト原虫の作製、遺伝子ノックアウトによる滑走運動と赤血球侵入に影響する原虫分子の同定(愛媛大学 プロテオサイエンスセンターと長崎大学 熱帯医学研究所で実施)

1-1) コムギ無細胞タンパク質合成法により作出された、マラリア原虫メロゾイトのタンパク質に対する抗体ライブラリーを用いて、メロゾイトの滑走運動後に残すと考えられる関連分子の軌跡を免疫染色し、光学顕微鏡により検出する。どの分子が滑走運動に関わっているのか軌跡の長さにより評価する。

1-2) 軌跡評価により候補となった分子のうち、データベースにおいて必須遺伝子であり且つ膜貫通ドメインを持つ分子について、薬剤誘導型コンディショナルノックアウト原虫を作出するため、Di-CRE/loxP システムを用いて該当遺伝子内に loxP 部位を挿入した遺伝子組換えマラリア原虫を作成する。

1-3) 滑走運動と赤血球侵入に関わる原虫分子の同定：得られた薬剤誘導型コンディ

シヨナルノックアウト原虫をラパマイシン誘導で Di-CRE を活性化し、目的遺伝子をノックアウトする。ノックアウト原虫をプレート上に播種し、滑走運動の変化を解析することで滑走運動に関わる原虫分子の同定を行なう。さらに、ノックアウト原虫による赤血球侵入時の赤血球変形と赤血球侵入能を測定し、滑走運動と赤血球侵入に相互関与する分子を同定する。

2) 滑走運動に関わる分子の赤血球侵入との関連性：滑走運動に関わる分子の抗体による滑走運動と赤血球侵入の阻害効果（愛媛大学 プロテオサイエンスセンターで実施）

1-1) で得られた滑走運動に関与する分子の抗体を用い、マラリア原虫メロゾイトの滑走運動がどの程度阻害されるか光学顕微鏡を用いたメロゾイト滑走運動測定法により評価する。また、候補分子が赤血球侵入をどの程度阻害するのかを赤血球侵入阻害試験により測定する。

③ 予想される成果

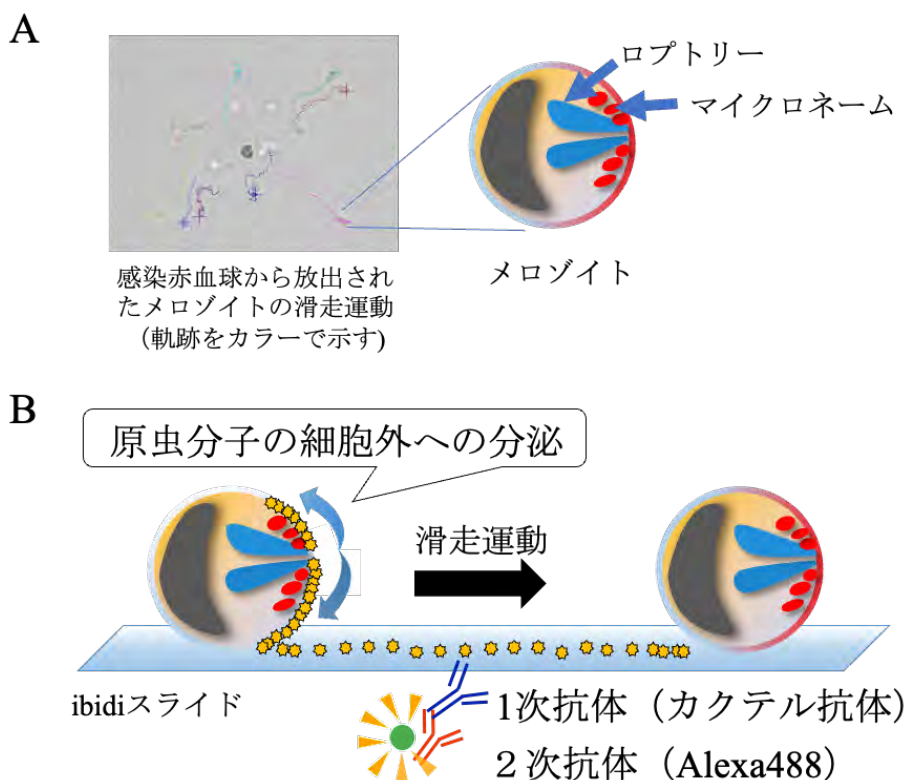
マラリア原虫メロゾイトの滑走運動の発見により、メロゾイトの赤血球接着後に起こる赤血球変形が滑走運動によることがわかったが、具体的にどのような原虫表面分子が滑走運動に関わっているのか、メロゾイト滑走運動を評価する手段を擁する申請者らにより明らかとなると考える。また、本研究により同定された滑走運動に関わる分子はワクチン抗原候補になりうるのか、赤血球侵入阻害実験により証明する。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

マラリア原虫の滑走運動に関わる分子として、宿主肝臓細胞侵入原虫であるスポロゾイトの細胞表面に局在する Thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) と Circumsporozoite protein (CSP) が知られており、CSP を標的とした RTS,S/AS01 は 2021 年にマラリアワクチンとして世界で初めて WHO より承認されている。メロゾイトにおける TRAP の相同体である Merozoite-TRAP (MTRAP) は赤血球侵入に関わっていないことがこれまで報告されていることから、メロゾイトの滑走運動の原虫分子は不明である。

本研究では、マラリア原虫メロゾイトの滑走運動に関わる原虫分子を同定するため、熱帯熱マラリア原虫 (Pf3D7) のシズントを MACS より精製した。精製したシズントを ibidi スライドに播種し 37°C にて 1 時間静置した後、倒立顕微鏡でメロゾイトが感染赤血球から放出されたことを確認した。放出されたメロゾイトを PFA で固定し、免疫染色法によりマラリア原虫分子の局在解析を蛍光顕微鏡でおこなった (図 B)。使用した 1 次抗体はコムギ無細胞タンパク質合成法により作出した、マラリア原虫メロゾイトのタンパク質に対する抗体ライブラリーから選択した 39 抗体を 4 グループに分けてカクテル抗体とした。また、2 次抗体として Alexa488 抗体を用いた。

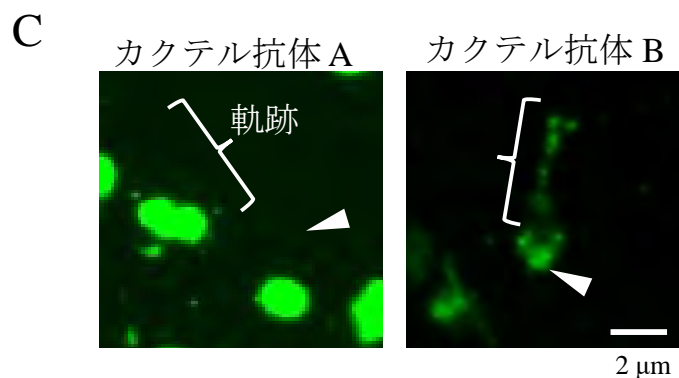


A: マラリア原虫メロゾイトの滑走運動 (ライブイメージング)

B: メロゾイトの滑走運動に関わる分子の検出 (免疫染色法)

② 成果（結果＋考察）

カクテル抗体 A (10 抗体) とカクテル抗体 B (11 抗体) の 2 グループの抗体を用いた免疫染色法により、メロゾイト表面とメロゾイトがスライド上に残したと考えられる原虫分子による軌跡を検出することができた (図 C)。蛍光抗体により検出した原虫分子の軌跡は、ライブイメージングでメロゾイトが移動した軌跡 (図 A) と類似していることから、使用した抗体に対する原虫抗原は滑走運動に関わる原虫分子であることが示唆された。現在、カクテル抗体のうち、どの抗体によって軌跡が検出できるのか引き続き解析をおこなっている。今後、軌跡として見られる原虫分子を同定し、その原虫分子をノックダウン/ノックアウトすることにより、メロゾイトの滑走運動、さらには赤血球侵入に対する影響を調べる予定である。



C: カクテル抗体によるメロゾイト滑走運動に関わる原虫分子の検出
(矢印はメロゾイト)

③ 成果の公表

得られた成果は現時点で未発表であるが、今後、学会発表や論文発表を行なう予定である。

6. 自己評価

マラリア原虫メロゾイトの滑走運動に関わる分子を明らかにするため、関与する分子が細胞外に分泌された際に残る軌跡を検出するにあたり、マラリア原虫の抗体ライブラリーを用いて結果が得られたことは、本研究の目的である原虫分子の解明に向けて一定の成果は得られたと評価できる。しかしながら、新たな研究環境の整備のために時間が掛かったので、今回得られた結果を元にワクチンや創薬に繋がる研究に発展させていきたい。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

2022 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : Seroepidemiology and molecular characterization of Yellow fever, Dengue and Zika virus infection in the Democratic Republic of the Congo.

Project number : 2022 – Ippan – 28

2 . Principal investigator : (Institut National de Recherche Biomédicale (INRB)/ Head of Virology Department) Professor Steve Ahuka Mundeke.

Joint researcher(s) :

- (Institut National de Recherche Biomédicale (INRB)/ Head of clinical virology unit at the Virology of Department) Professor Sheila Makiala Mandanda.
- (Institut National de Recherche Biomédicale (INRB)/ Scientist at the Virology Department) Dr Pierre Mutantu Nsele.
- (Institut National de Recherche Biomédicale (INRB)/ Medical biologist at the Virology of Department) Elisabeth Pukuta Simbu.
- (Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University/ Associate professor at the Virology of Department) Mya Myat Ngwe Tun
- (School of Tropical Medicine and Global Health, Kenya Research Station) Professor Shingo Inoue

3 . Amount decided : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

- To develop a sensitive and specific in-house ELISA for the surveillance of Yellow Fever, Dengue, and ZIKA and secondly to characterize YFV, DENV, and ZIKV DRC's isolates.

(2) Research content

This study is related to the research conducted at the Department of Virology / Institute for Tropical Medicine (NEKKEN). Specific monoclonal antibodies against YFV envelop (E) protein and nonstructural protein 1 (NS1) have been developed in the Department of

Virology/NEKKEN, including YF recombinant E protein. These tools will be used to establish in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis during the acute phase [(NS1 antigen detection by ELISA) and IgM capture ELISA] and to investigate the past infection history (IgG ELISA). Furthermore, neutralization test (NT) using YF vaccine strain (YFV 17D) will be optimized and used as gold standard. Concerning Zika and Dengue viruses, IgG/IgM capture ELISA and NT tests protocols from the Department of Virology /NEKKEN will be used to detect positive cases in DRC. In addition, newly in-house NS1 antigen detection by ELISA will be established by using anti-Dengue and anti-Zika NS1 monoclonal antibody which have been also developed in the department of virology/NEKKEN. Overall, this study is a collaborative support research and technology transfer between the department of Virology/NEKKEN and the department of Virology/INRB.

Study design: A retrospective study will be conducted using YF network surveillance samples collected in the last nine years (2012-2021).

Material and methods:

Specific anti-YFV IgG and NS1, anti-ZIKV NS1, and anti-DENV NS1 monoclonal antibodies (mAbs) will be used to establish an additional in-house ELISA system (YFV NS1 antigen detection ELISA, YFV IgM capture, and YFV IgG epitope blocking ELISA), DENV and ZIKV NS1 antigen detection ELISA).

YFV recombinant E protein, YFV 17D, DENV, and ZIKV purified antigens and purified mAbs will be provided by the department of Virology /NEKKEN.

Lyophilized samples from DRC will be transported to NEKKEN for ELISA and neutralization (NT) tests. In case DRC samples cannot be shipped to Japan for any technical reason, NT tests will be performed in DRC.

From all positive samples confirmed by NT tests, virus isolation on Vero cells will be performed in DRC. From the isolates, ARN will be sent to NEKKEN for sequencing and phylogenetic characterization.

Ethical considerations: patient's serum samples will be used for research only and their names will be anonymized. Demographic and clinical information related to each patient's sera will be kept confidential. No third party will have access to the database. This protocol will be submitted to both NEKKEN and DRC ethical committees.

Study population: Human serum samples from the DRC YF surveillance network.

Inclusion criteria: Serum samples collected from 2012 to 2021 stored at the INRB biobank that have demographic and clinical information.

Exclusion criteria: Samples without clinical or demographic information, little sample volume, poor quality sample (hemolysis serum).

Sample size: hundred positive samples and 300 negative samples will be included in this study.

(3) Expected results

We are expecting **(1)** to establish highly sensitive and specific in-house ELISA method for the diagnosis of YF, DENGUE, and ZIKA. The neutralizing test will be used as gold standard to evaluate the performance of the newly developed assays; **(2)** characterize YFV, DENV, and ZIKV isolates from DRC, **(3)** to enhance the DRC laboratory diagnosis capacity.

5 . Implementation report :

(1) Circumstances of Implementation against the FY2022 Implementation Plan

The Democratic Republic of the Congo (DRC), is one of the biggest countries located in Central Africa. The country is facing resurgence of emerging infectious diseases such as Ebola, Monkeypox, Yellow Fever. The Institut National de Recherche Biomédicale (INRB) is the national public health laboratory in charge of diagnosis and surveillance of infectious diseases in DRC. At INRB, the serodiagnosis of infectious diseases relies on the commercial kits. In particular, we used to detect IgG and IgM against YFV, DENV, and ZIKV using commercial kits. However, these kits can still detect cross-reactive antibodies among flaviviruses. In addition, the confirmatory tests such as Neutralizing antibody tests, virus isolation and genotyping are lacking. Since 2020, INRB has acquired equipment and facilities

(BSL-2 and BSL-3) where experiments can be carried-out to easier the diagnosis and surveillance of emerging infectious diseases. In this research, most of experiment (ELISA, Cell culture, Neutralizing test) will be conducted in DRC whereas some have been already performed at NEKKEN (antigen preparation, monoclonal antibody purification and HRP-conjugation). Molecular characterization (sequencing, genotyping, phylogenetic analysis) of DRC isolates will be performed at Nekken and the DRC team need to be trained. The performance of YF, Dengue, and Zika in-house ELISA will be compared with the commercial kits using neutralizing antibody test as gold standard. Both INRB and Nekken researchers will be involved in discussing the results and in writing scientific papers. Also, the result will be shared during international conference. This joint research is planning to implement reliable IgG and IgM in-house Enzyme Linked Immunosorbent assays (ELISA) that could be utilized for the diagnosis and the surveillance of Yellow Fever, Zika, and Dengue in DRC. Also, during this study, we will implement neutralizing test for YF, DENGE, and ZIKA.

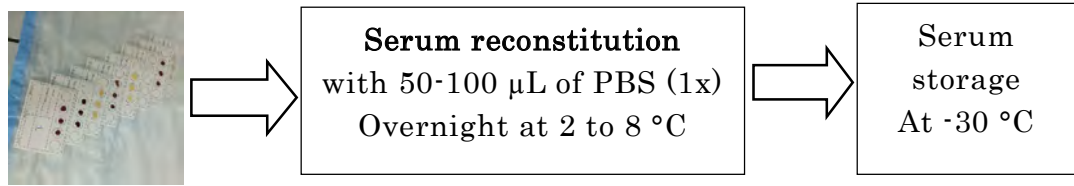
(2) Results (results & observations)

So far, experiments on YF IgG Indirect ELISA, IgM capture ELISA, and Neutralizing antibody test using 8 YF positive samples have been conducted at NEKKEN by Pierre Mutantu during his PhD training at NEKKEN. Samples collected on filter paper (DBS) were shipped to Japan with the support of JICA. The results are as follows:

(2)-1. Serum reconstitution using PBS:

Depending on the size of the dot on the filter paper, 50 to 100 microliters of PBS 1x was used to extract the serum from the paper. The surface of DBS containing the drop was cut and soaked in PBS and kept in the fridge (2-8 °C) overnight. Then, samples were stored at – 30 °C.

DBS



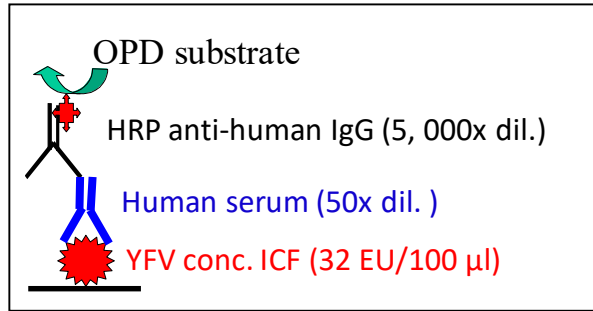
(2)-2. Antigen preparation

- ❖ The vaccine strain of Yellow Fever Virus (YFV 17D) was propagated in Vero Biken cells without foetal calf serum. After cells have shown cytopathic effect (CPE), the supernatant containing virus proteins was collected and concentrated using Jumbo cep method. The retentate was used as assay antigen at the optimal concentration of 32 Elisa units (EU). We used both IgG indirect ELISA and IgM capture method to check whether these samples were IgG or IgM positive.
- ❖ Other antigens (YFV 17D, Dengue virus (DENV) tetravalent antigen, and Zika virus (ZIKV) were prepared by ultracentrifugation method at NEKKEN. These antigens have been sent to DRC at the beginning of March 2023.

(2)-4 Immunoglobulin G (IgG) indirect ELISA

The Maxisorp plate was coated with 32 EU YFV 17D Jumbo cep concentrated antigen at 2 to 8 °C overnight in coating buffer. The following day, 100 µL of BlockAce was added and the plate was incubated at 37°C for 1 hour. The plate was washed three times with PBS-Tween (PBS-T) and 100 µL of 50 times diluted samples in PBS-T was added. After 1 incubation at 37 °C, the plate was 3 times washed with PBS-T. Then, 100 µL/well of the conjugate (HRP-anti human IgG American Qualex A110 PD) diluted at 5,000x in PBS-T $1/10$ BlockAce was added. The plate was again incubated 1 hour at 37°C. After washing step, 100 µL/well of the OPD substrate was added and the plate was incubated at room temperature in the dark for 1 hour. Finally, 100 µL/well of 1 N Chloridric acid to stop the reaction. The plate was read at 450 nm optic density.

IgG indirect ELISA Diagram result



ELISA plate

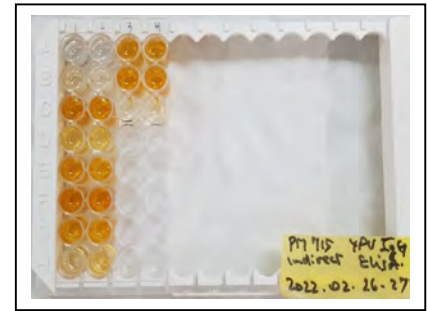


Plate arrangement

Plate arrangement				
ID	1	2	3	4
A	Blank	Blank	YF 07	YF 07
B	NC	NC	YF 08	YF 08
C	YF 01	YF 01	PBS-T _{1/10} BA	PBS-T _{1/10} BA
D	YF 02	YF 02		
E	YF 03	YF 03		
F	YF 04	YF 04		
G	YF 05	YF 05		
H	YF 06	YF 06		

IgG Indirect ELISA result

PM 715 YFV IgG indirect ELISA {2022.02.27}

ID	1	2	Mean OD	Mean OD-blank	Result
Blank	0.043	0.056	0.050	0.00	
NC	0.279	0.156	0.218	0.17	-
YF sample 1	2.700	2.585	2.643	2.59	+
YF sample 2	0.782	0.684	0.733	0.68	-
YF sample 3	2.102	2.095	2.099	2.05	+
YF sample 4	3.032	3.219	3.126	3.08	+
YF sample 5	2.149	1.989	2.069	2.02	+

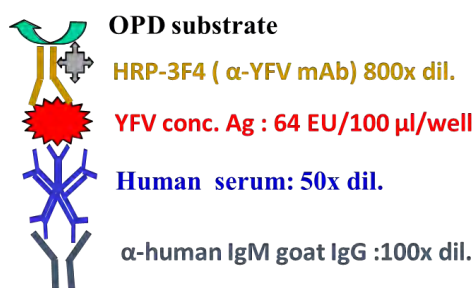
YF sample 6	0.346	0.626	0.486	0.44	-
YF sample 7	1.628	1.902	1.765	1.72	+
YF sample 8	2.600	2.824	2.712	2.66	+
PBS-T _{1/10} BA	0.148	0.239	0.194	0.14	-

Summary: Of 8 samples examined by IgG indirect ELISA, 6 were Ig G positive.

(2) -5 Immunoglobulin M (IgM) capture ELISA

The Maxisorp plate was coated with 100 µL/well of anti-human IgM (µ chain specific) in coating buffer at 4°C overnight. The following day, 100 µL of BlockAce was added and the plate was incubated at 37°C for 1 hour. Then, the plate was washed three times with PBS-T, and 100 µL of 50 times diluted samples in PBS-T was added. After 1 hour incubation at 37 °C, the plate was 3 times washed with PBS-T. Then, 64 EU YFV 17D antigen diluted in PBS-T_{1/10} BlockAce was added, and the plate was again incubated 1 hour 37 °C. After washing step, 800 times diluted in PBS-T of HRP-anti YFV monoclonal antibody (3F4) was added. After washing step, 100 µL/well of the OPD substrate was added and the plate was incubated at room temperature in the dark for 1 hour. Finally, 100 µL/well of 1 N Chloridric acid to stop the reaction. The plate was read at 450 nm optic density.

IgM capture ELISA Diagram



ELISA plate result

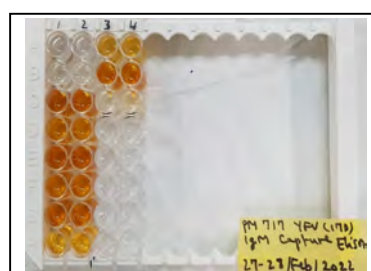


Plate arrangement

ID	1	2	3	4
A	Blank	Blank	YF 07	YF 07
B	NC	NC	YF sample 8	YF sample 8
C	YF sample 1	YF sample 1	PBS-T _{1/10} BA	PBS-T _{1/10} BA
D	YF sample 2	YF sample 2		
E	YF sample 3	YF sample 3		
F	YF sample 4	YF sample 4		
G	YF sample 5	YF sample 5		
H	YF sample 6	YF sample 6		

IgM capture ELISA RESULT

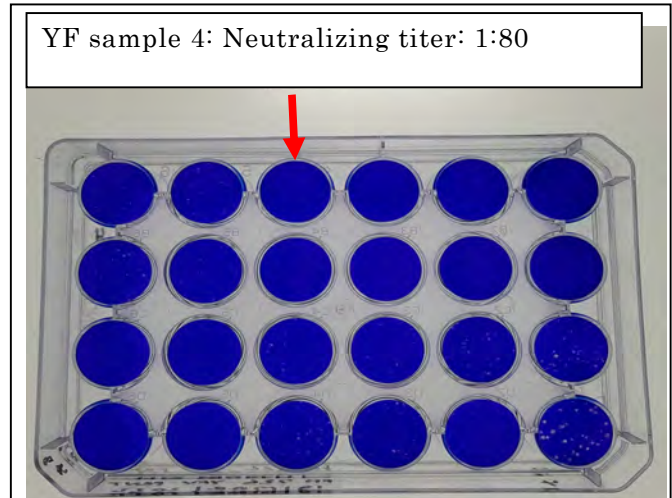
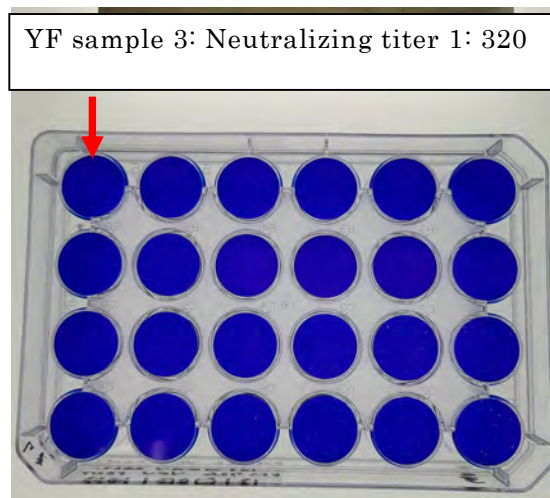
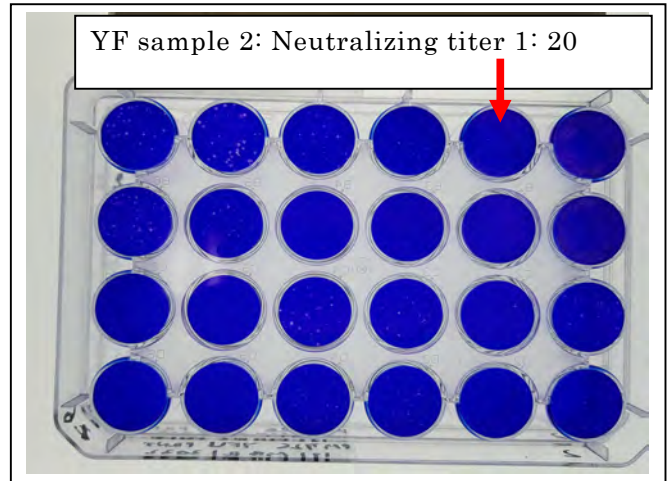
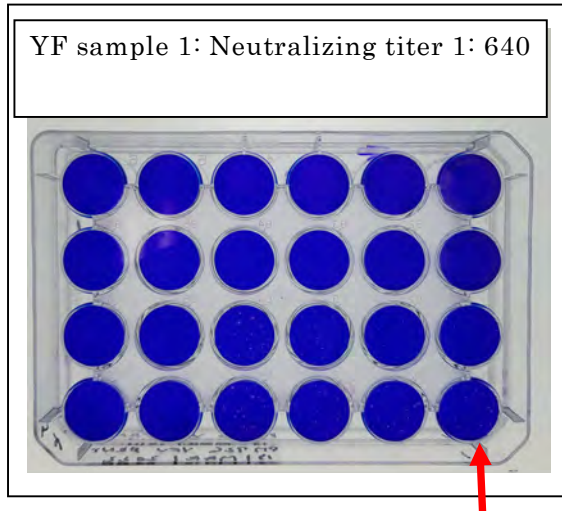
PM 717 YFV IgM capture ELISA
{2022.02.28}

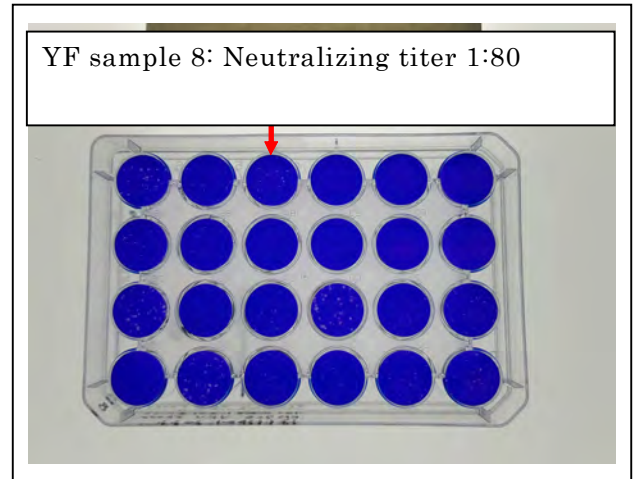
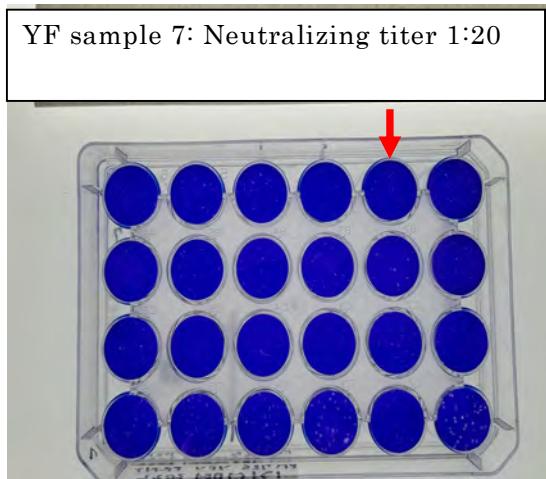
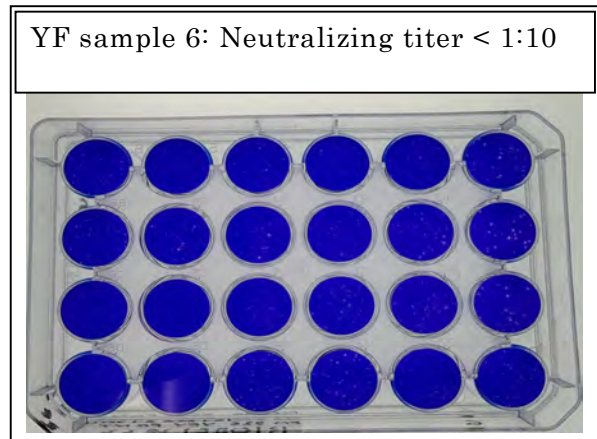
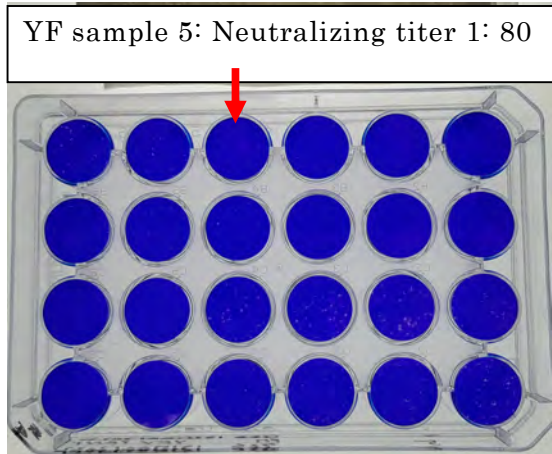
	1	2	Mean OD	Mean OD-blank	PN ratio	Result
Blank	0.044	0.044	0.044	0.000	0.00	
NC	0.095	0.097	0.096	0.052	1.00	-
YF 01	3.952	4.000	3.976	3.932	75.62	+
YF 02	2.540	2.460	2.500	2.456	47.23	+
YF 03	4.000	4.000	4.000	3.956	76.08	+
YF 04	3.131	3.149	3.140	3.096	59.54	+
YF 05	3.643	3.855	3.749	3.705	71.25	+
YF 06	1.317	1.481	1.399	1.355	26.06	+
YF 07	1.003	1.164	1.084	1.040	19.99	+
YF 08	3.897	3.963	3.930	3.886	74.73	+
PBS-T _{1/10} BA	0.097	0.224	0.161	0.117	2.24	-

Summary: all 8 samples were IgM positive

(2) -6 Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT)

PRNT50 test was performed using Vero Biken cell line. Seven samples showed neutralizing titer $\geq 1:20$. Only one sample was negative (Neutralizing titer below $1:10$)





(3) Announcement of results

As shown on the table below, all 8 samples were YF positive. Seven were PRNT positive while one was negative but strongly IgM positive.

Sample ID	IgG SN ratio	Result	IgM PN ratio	Result	PRNT ₅₀	Result
YF 01	2.59	+	75.62	+	1:640	+
YF 02	0.68	-	47.23	+	1:20	+
YF 03	2.05	+	76.08	+	1:320	+
YF 04	3.08	+	59.54	+	1:80	+

YF 05	2.02	+	71.25	+	1:80	+
YF 06	0.44	-	26.06	+	< 1:10	-
YF 07	1.72	+	19.99	+	1:20	+
YF 08	2.66	+	74.73	+	1:80	+

6 . Self-evaluation

We were supposed to implement this projet within one year (from April 2022 to April 2023). The implementation of this project is delayed due to logistical issues. The DRC team received some reagent and material on March and May of 2023. The DRC team is now setting-up ELISA spectrophotometer and will start experiment soon.

7 . Attainment level (circle one of I to IV below)

- I (Few expected results were achieved.)
- II (Not fully satisfied, but certain results were achieved.)
- III (The expected results were attained with full satisfaction.)
- IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ヒト iPS 由来肝細胞および肝オルガノイドを用いた熱帯熱マラリア原虫の感染特性の解析

課 題 番 号：2022-Ippan-30

2. 代 表 者：

（感染分子解析学分野・客員研究員）片上幸美

共同研究者：

（細胞環境構築学分野・教授）徳舛富由樹

（免疫病態制御学分野・准教授）水上修作

（細胞環境構築学分野・助教）宮崎真也

（分子感染ゲノミクス解析分野・特任研究員）宮崎幸子

（長崎大学病院消化器内科・准教授）宮明寿光

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

寄生虫をはじめとする病原微生物の多くは、人体に侵入する最初の段階で肝臓に感染する。マラリア原虫は、蚊の吸血時に皮膚から侵入し、血流に乗って全身に移動するが、感染が成立し増殖できるのは肝臓でのみであり、虫体数では 30%程度にとどまる。病原微生物の感染成立過程で肝臓の役割が大きいことを示す事例は多く、肝臓の脂質代謝異常である脂肪肝がウイルス感染症の重症化要因となることも知られている。その要因を分子レベルで解明すべく、病原微生物が肝細胞に接触・侵入して感染に至る現象を *in vitro* で再現する実験ツールとして、ヒト iPS 細胞を選択した。糖代謝異常の疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した肝細胞で、アルブミンの発現量が低下する現象が観察されたことから、糖代謝に係る一塩基の突然変異が、タンパク質合成にも影響している可能性が考えられた。肝臓における糖質・脂質・タンパク質の代謝システムには相互関係があり、代謝機能の変化で肝細胞の状態が変動し、病原性微生物が肝細胞に侵入する際の反応性に影響することが考えられる。本研究では、健常者および肝臓の代謝異常の患者から樹立した iPS 細胞を用い、そこから分化誘導した肝細胞および肝オルガノイドに対するマラリア原虫の感染特性を評価する。肝臓の生理状態に起因するマラリア原虫の感染特性の違いや、肝細胞期マラリアと肝臓の代謝機能との関係を明らかにすることを目的とする。

② 研究内容

本研究では、健常者および肝臓の代謝異常の患者から樹立した iPS 細胞を用い、そこから分化誘導した肝細胞および肝オルガノイドに対するマラリア原虫の感染特性

を評価する。肝臓の生理状態に起因するマラリア原虫の感染特性の違いや、肝細胞期マラリアと肝臓の代謝機能との関係を明らかにしようとするものである。

1年目

- ・ 既存の健常者由来 iPS 細胞株および糖原病患者由来 iPS 細胞から肝細胞 (2D 培養) および肝オルガノイド (3D 培養) を作製し、脂質および糖質の代謝実験モデルを構築する。
- ・ 脂肪肝患者由来の末梢血単核球から疾患特異的 iPS 細胞株を樹立する。
- ・ 疾患特異的 iPS 細胞由来の肝細胞および肝オルガノイドの作製方法を樹立する。
- ・ 蚊ステージ熱帯熱マラリア原虫の培養方法と通常培養肝細胞への感染実験系を確立する。

2年目

- ・ 健常者および代謝異常患者由来の iPS 細胞から肝細胞および肝オルガノイドを作製し、熱帯熱マラリア原虫を感染させる実験系を最適化する。
- ・ 肝臓モデルにおける熱帯熱マラリア原虫の感染特性および代謝機能との関係を解析する。

材料

ヒト iPS 細胞

健常者由来 iPS 細胞株

2021 年 4 月に理化学研究所より購入、ストックした細胞株 201B7 を使用する。

疾患特異的 iPS 細胞株

糖原病患者由来 iPS 細胞株 番号 HPS3926 理化学研究所より購入予定。

NAFLD 患者由来 iPS 細胞株 本研究 1 年目に樹立予定。

蚊ステージ熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)

NanoLuc および GFP を恒常的に発現する熱帯熱マラリア原虫レポーターラインを使用する。このレポーターラインが感染したハマダラカの唾液腺からスポロゾイト期原虫を調製する。

方法

ヒト末梢血単核球からの iPS 細胞株樹立

末梢血 9 mL を採取し、Lymphoprep を用いて単核球を分離する。得られた単核球分画を、サイトカインを添加した血球培養培地中で 5 日間前培養する。細胞を回収し、4D-Nuclerfactor (Lonza) を用いて初期化遺伝子を導入後、出現したコロニーをピックアップする。得られた細胞を未分化維持培地で継代培養し、4 代目の細胞について核型解析および STR 解析を行う (外注)。正常な染色体数およびドナーの遺伝情報を保持している細胞を iPS 細胞株としてストックする。

ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導 (図 2)

ヒト iPS 細胞株のストックを解凍し、未分化培地で 5 日間培養した後に継代する。起眠から 2 代目以降の細胞を 96 well plate に 1×10^8 cells/well で播種し、専用培地を用いて内胚葉細胞に分化させる。得られた内胚葉細胞を回収し、細胞濃度を変えて再播種した

後、肝細胞を分化誘導する。

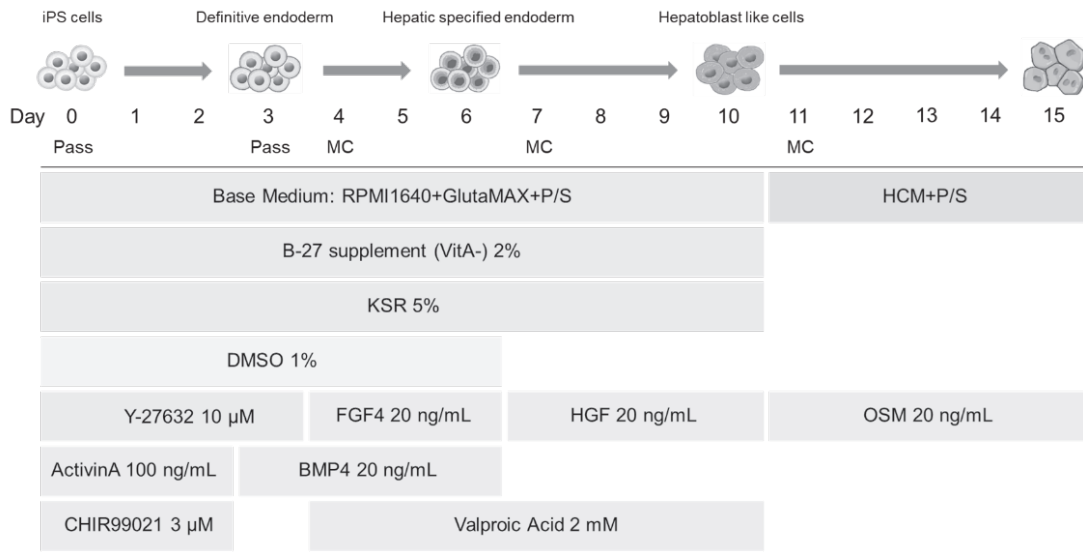


図 2. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製方法 (Katagami et al., 2020)

代謝性疾患の in vitro 病態モデル構築

① 脂肪代謝モデル

肝細胞の維持培地に、濃度および暴露期間を変えてオレイン酸を添加し細胞内の油適量を増加させる。脂肪の蓄積は中性脂質を染色する蛍光試薬を使用した顕微鏡観察と細胞内脂質量の変化により評価する。培養した細胞から FOLCH 法により脂質を抽出する。酵素法により、総コレステロール中性脂肪、遊離型コレステロールおよびリン脂質の量を測定し、細胞 1g あたりの脂質量を、健常人由来の iPS 肝細胞と非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者由来の iPS 肝細胞とで比較評価し、脂肪肝の病態再現モデルを確立する。

② 糖代謝モデル

肝性内胚葉期まで分化誘導した細胞を、グルコース無添加 DMEM/F12 改変培地で培養し肝細胞に分化させる。グルコースフリーで 5 日間培養した後、グルコース添加濃度を変えて 48 時間継続培養する。得られた細胞を回収し、蛍光染色法により細胞中のグリコーゲン量を定量する。同様に培養した細胞を 4% PFA で固定して PAS 染色し、ImageJ を用いてグリコーゲン量を可視化する。

肝オルガノイドの作製 (3D 培養) (図 3)

ヒト iPS 細胞は、ストックから起眠したものを 5 日ごとに継代培養して使用する。分散材を用いて単一細胞としたものを 1×10^5 cells/cm² となるように培養プレートに播種し、専用培地中で 5 日間培養してスフェロイドを形成させる。培養 6 日目に、形成されたスフェロイドを回収し、コーティング剤のドロップに封入して継続培養する。免疫染色により、アルブミンの発現、CD166 陽性肝星細胞様細胞および CD68 陽性クッパー細胞様細胞の存在を確認する。

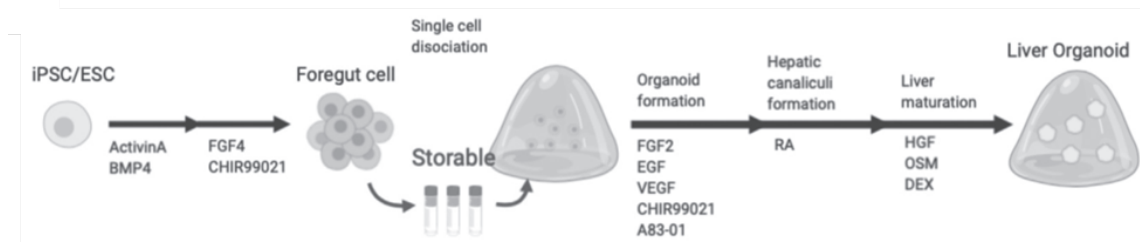


図 3. ヒト iPSC 細胞由来肝オルガノイドの作製方法 (Shinozawa et al., 2021)

熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトを用いた肝内期の解析

熱帯熱マラリア原虫レポーターラインのガメトサイトをハマダラカに感染させる。感染から 14 日後から 21 日後にハマダラカの唾液腺を解剖し、その中に存在するスポロゾイト期の原虫を回収する。調製したスポロゾイトを上記の方法で作出した肝細胞および肝オルガノイドに感染させる。肝細胞への感染から 1 日後、3 日後、7 日後、10 日後にレポーター遺伝子の発現をモニターし、肝内期の状態を評価する。並行して原虫タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色を行い、肝内期原虫の形態や肝内期特異的タンパク質の発現を評価する。

参考文献

Katagami et al., Stem Cell Research (49), 102925, 2020
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102095>
 Shinozawa et al., Gastroenterology (160) 831-846, 2021

③ 予想される成果

ヒト iPSC 細胞から分化誘導した肝細胞は、肝臓の基本的な機能を実験室で簡易に再現できるツールとなる。さらに、3次元培養で得られる肝オルガノイドは、より生体に近い状態で、肝機能や病原性微生物に対する分子生物学的解析を可能にする。疾患特異的 iPSC 細胞からの肝オルガノイド作製、および病態再現は現在のところ実現しておらず、代謝性疾患を *in vitro* で評価するためのモデル構築は、疾患の解析および治療薬の開発において重要な役割を持つ。細胞環境構築学分野では、評価が難しいとされる脂肪の蓄積について定量的解析が可能であり、肝オルガノイドにマラリア原虫を感染させ、その後の経過を追跡できることから、世界的評価基準の策定に繋げられる。肝臓の生理状態に起因するマラリア原虫の感染特性の違いや、肝細胞期マラリアと肝臓の代謝機能との関係を明らかにできれば、感染防御の一助となり、治療薬の開発にも繋がる。本研究で構築する肝細胞・肝オルガノイド感染モデルは、他のウイルス性疾患等にも応用範囲を広げることが可能である。

5. 実施報告

(1) ヒト iPS 細胞株の導入

健常者由来 iPS 細胞株①HPS0063（登録番号 201B7）②HPS1046 を理化学研究所バイオリソース研究センター（理研 BRC）より入手した。さらに、既存の③HPS0354（登録番号 585A1）および④熱研オリジナル樹立株（仮称：IR2201）を、ヒト iPS 細胞用フィーダーレス培地 StemFit®AK02N（リプロセル）を用いて培養した。60mm dish で起眠後、6-well plate を用いて継代した。播種時は培地に Y-27632 を 10nM 添加し、翌日これを含まない培地に置換した。継代 3 回目（継代数は株により異なる）まで播種数 13000 cells/well で 7 日間、1 日おきに培地交換を行った。凍結ストックを作製後、分化誘導実験のため 24-well plate で引き続き継代した。

分化誘導実験と並行して 24-well plate で継代培養を行う際は、細胞播種数を①2000、②4000、③8000 cells/well とし各株 3 well を作製した。播種時は培地量を 500 μ L/well、培養 3 日目から 1 mL/well とし、以後は 7 日目に 70~80% コンフルエントとなった well から次のプレートを作製することとした。手順を標準化することにより、対象とする全細胞株から継続して実験を行う体制が整った。

(2) ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導

研究代表者の方法による肝細胞分化誘導を試みた。

- 96-well 細胞培養プレートを用い、15 日間の分化誘導による平面培養系を樹立した。ラミニン 521 と Corning 社 Matrigel によるプレートコーティングを検討した結果、Matrigel がより分化誘導に適していると考えられた。
- 分化誘導 11 日、13 日、15 日目のプレートを 4%-PFA 固定して蛍光染色したところ、肝細胞のマーカーである HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α) と AFP (α -fetoprotein) の発現が確認できた。前駆細胞の分化から成熟に至る過程で、各マーカーの発現量に変化が見られた。
- 分化誘導開始 15 日目以降、1 日おきに培地を 1/2 量交換しながら 30 日目までプレートを維持した。11、15、18、21、24、27 および 30 日目に 4%-PFA 固定して蛍光染色し、肝細胞の発現マーカーを検出した。HNF-4 α 、AFP に加え、アルブミン (ALB) と CYP3A4 の発現が確認できた。各マーカーの発現量は分化誘導開始 15 日目で最大となり、その後緩やかに減少した。201B7 と HPS1046 の結果を図 4 に示す。

(3) 肝前駆細胞の回収および分化途中での凍結保存

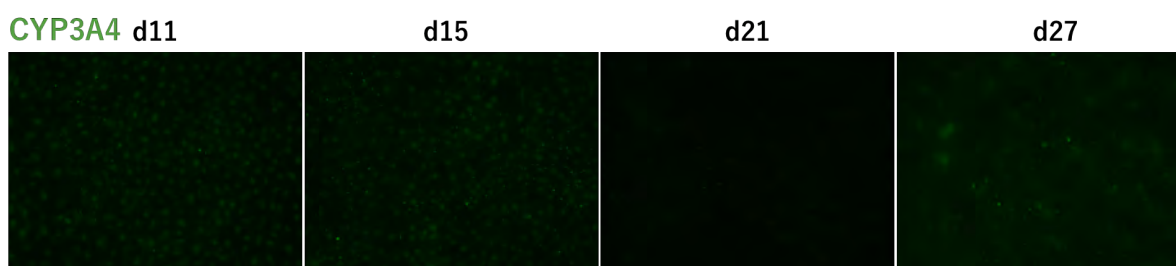
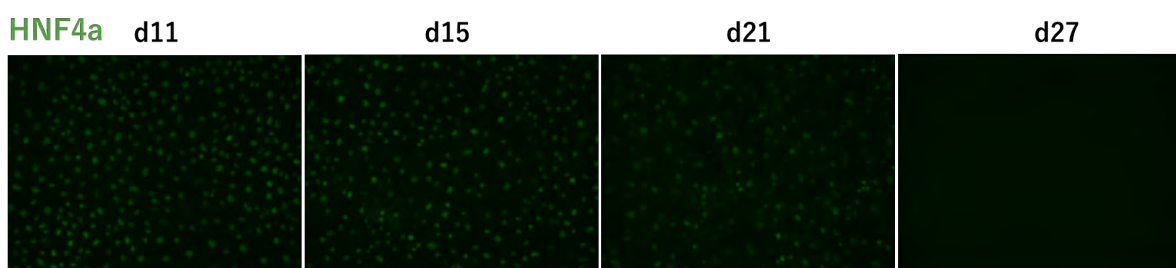
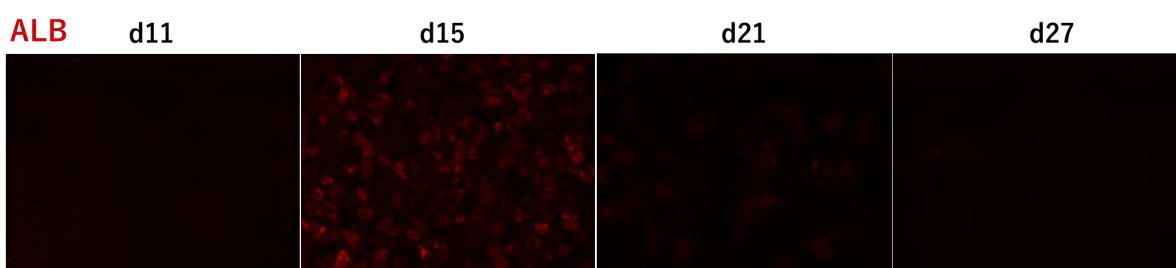
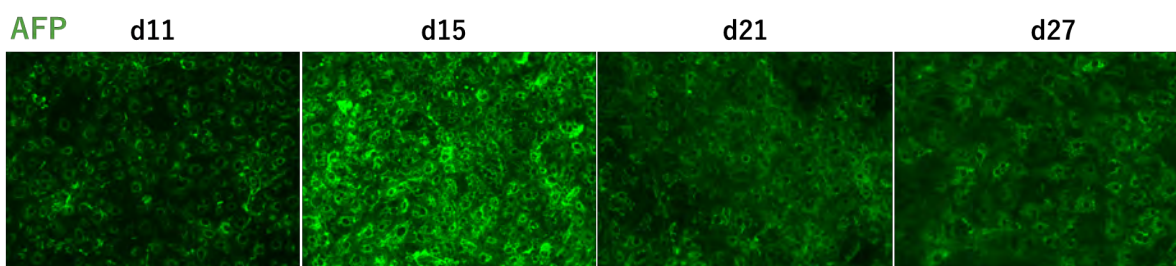
感染実験を行うにあたり、肝前駆細胞の回収・凍結保存による成熟肝細胞の効率的分化誘導を試みた。健常者由来 iPS 細胞 4 株から胚性内胚葉細胞を分化誘導した後、細胞濃度 1/6 で継代してさらに分化誘導を行った。回収細胞数を高めるため、本目的については 24-well plate を使用した。開始から 10 日目まで同様の分化誘導を行い、11 日目に TrypLE select enzyme を用いて細胞を剥離し、StemCellbanker に懸濁して -80°C で凍結した。この手法により、凍結保存可能な肝前駆細胞 2~7 $\times 10^5$ /tube/0.5mL Cellbanker/strain (Viability >88%) を得た。

(4) 肝前駆細胞の凍結ストック起眠と分化再開

Matrigel コーティングした 96-well plate に回収・凍結保存した肝前駆細胞を起眠して播種し、成熟肝細胞の効率的分化誘導を試みた。実験は、201B7 と HPS1046 の回収

肝前駆細胞で行った。起眠に使用する培地は回収時（分化誘導 day 10）の組成と同一とし、10 nM の Y-27632 を添加した。細胞数は、24-well plate の 1 well が 96-well plate 6 well 分に相当するとみなして決定した。起眠翌日、細胞の接着を確認してヒト肝細胞用培地 HCM™（Lonza）に置換した。起眠翌日を iPS 細胞からの分化誘導 11 日目に相当すると仮定し、評価のためこの段階の細胞を 4%-PFA で固定した。その後、1 日おきに培地を半量交換し、15 日目まで培養を継続した細胞を同様に固定した。

201B7



HPS1046

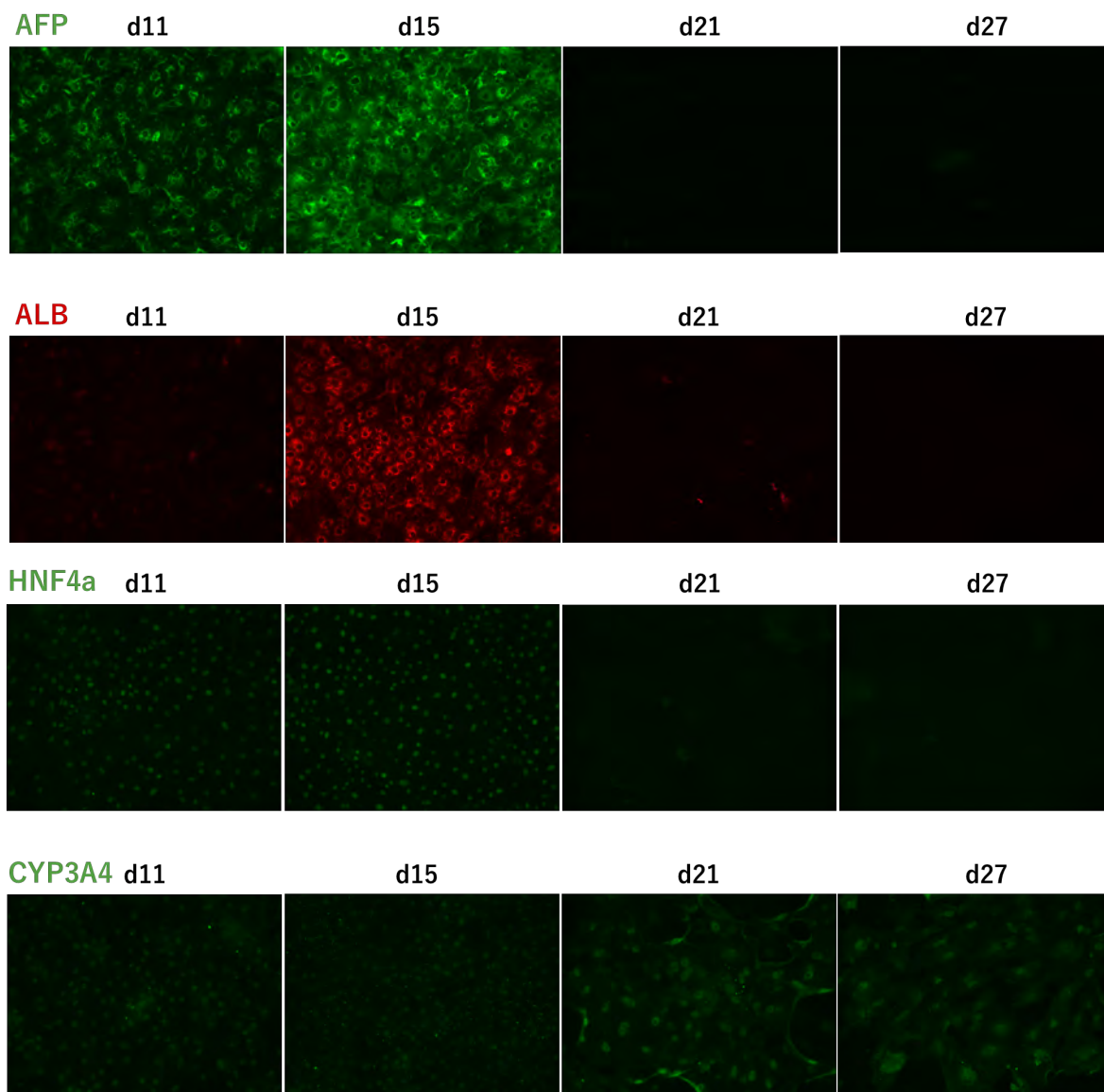


図 4. 201B7 および HPS1046 由来肝細胞の蛍光染色結果

① 成果（結果＋考察）

熱研オリジナル株を含め、分化および感染実験に使用可能なヒト iPS 細胞のストックを十分量確保できた。肝細胞への分化誘導と評価方法については、iPS 細胞からの分化誘導および肝前駆細胞からの成熟過程再現に可能性があり、マーカーの発現量により成熟過程を評価できる体制が整った。ヒト iPS 細胞由来肝細胞をプラットフォームとする感染症モデル確立に向け、品質の安定性確保とプロトコル化を目指す。3D 培養については費用対効果の面から再考を要する結果となったため、今後は平面培養系を中心としてマラリア原虫の感染特性評価を進める。

② 成果の公表

なし

6. 自己評価

本研究は実施期間を2年で計画し、1年目はiPS細胞株を導入して実験体制を整えるとともに、マラリア原虫の肝細胞への感染を成立させるまでを目標としていた。しかし、細胞の培養条件絞り込みに難航し、感染実験の実施に至らなかった。肝細胞のスフェロイド形成からオルガノイド維持に係る3D培養系の構築は、より生体に近い環境下で病原微生物の感染特性を評価できることが期待されるが、今年度は96-well細胞培養プレートによる2D評価系に留まった。

一方、ヒトiPS細胞から肝細胞を分化誘導するには長期培養が必要となるが、本研究において、肝前駆細胞の回収・凍結保存が可能であることが判明し、これを起眠して分化を再開することにより成熟肝細胞を得られる目途が立った。マラリア原虫の感染実験実施にあたっては、感染能を持つ原虫とプラットフォームとなる細胞培養プレートの準備のタイミングを合わせることが1つの課題であるが、この技術はより簡易な実験の実現に向けて有用であると考えられる。経時的な肝細胞マーカー発現量の追跡により、成熟ステージの異なる*in vitro*評価モデルを構築できる可能性がある。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：マラリア原虫感染による赤血球膜脂質構成変化のナノスケールレベル解析

課 題 番 号：2022-Ippan-31

2. 代 表 者：藤田 秋一（鹿児島大学共同獣医学部・教授）

共 同 研 究 者：正谷 達膳（岐阜大学応用生物科学部・准教授）

麻田 正仁（帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授）

馬場 みなみ（長崎大学熱帯医学研究所・助教）

金子 修（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に感染した赤血球では、原虫側から①原虫の inner membrane complex、②原虫の細胞膜、③寄生胞膜、④マウレル裂、⑤赤血球膜と、多重の膜構造が形成されている。これら膜構造は、原虫が赤血球を自身の発育に有利な環境とするため、赤血球を「改変」することで形成される。これまでの先行研究により、複雑な輸送機構を介して膜構造を経由した原虫由来の蛋白質が赤血球表面に輸送され、これらは栄養取り込み・免疫回避・細胞接着など原虫の発育や病原性の発現に関与することが明らかとなっている。とくに、感染赤血球表面に knob とよばれるコブ状の突起が形成され、血管壁への接着性が増強することは血管塞栓の原因につながる。すなわち、感染赤血球の細胞膜構造変化の詳細を明らかにすることは新規薬剤ターゲットの特定や治療法の開発につながる可能性がある。

これまでの多くの研究では、原虫由来または宿主蛋白質の分布・局在の評価を主に行われてきた。一方、膜構造の脂質に関しては原虫感染赤血球膜の脂質構成が変化するという報告があるものの、原虫による寄生胞膜、マウレル裂など各細胞膜の脂質構成の改変の詳細は明らかとなっておらず、脂質の構成変化が原虫の寄生にとってどのような意味があるのかもわかっていない。感染赤血球の細胞膜構成脂質の組成・局在変化に関する研究が少ない理由として、脂質を化学固定することが困難であり、通常の細胞生物学・生化学的手法ではアプローチしにくいことがあげられる。これを可能にする手法として、細胞膜やオルガネラ膜に存在する脂質成分を生きた状態とほぼ変わらない状態で急速に凍結し、さらに生体膜を物理的に固定し電子顕微鏡レベルで解析可能な「急速凍結急速切断レプリカ法 (QF-FRL 法) による膜脂質可視化技術」がある (Fujita et al., Nature Protocol, 2010)。本技術は急速に凍結した生体材料を切断し、炭素 (C) 及び白金 (Pt) でできた薄膜へ蒸着することで細胞膜上の脂質分子を固定し、レプリカ薄膜を作る。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 処理によって余分な生体分子を除去し、レプリカ薄膜へ裏打ちされた脂質分子や蛋

白質を特異的プローブにより標識する。さらに、金コロイド標識二次抗体により可視化することで、電子顕微鏡による分子の局在解析が可能となる。これまでに、本方法と脂質特異的プローブを組み合わせた観察技術によって、藤田を中心に哺乳類細胞や酵母のオルガネラやオートファゴソームに分布する脂質分子の局在が明らかにされてきた。そこで今回、本技術をマラリア原虫感染赤血球に適用することで、感染赤血球膜の脂質構成成分がどのように変化するのか(局在、組成など)を明らかにする。さらに赤血球膜だけでなく、原虫の細胞膜、寄生胞膜及びマウレル裂の脂質構成とその局在についても解明する。

② 研究内容

前年度の研究により、**マラリア原虫と感染赤血球において急速凍結・凍結切断レプリカ標識法が実施可能であること、哺乳類細胞と脂質分子の局在が異なる可能性が示された**。そこで本年度は、原虫のステージを同調させた上で精製し、同様に急速凍結・凍結切断レプリカ標識法を行い、単一ステージにおける原虫・寄生胞・赤血球膜の脂質分布を詳細に解析する。

① マラリア原虫と感染赤血球のレプリカの作製

熱帯熱マラリア原虫と感染赤血球を液体窒素にて急速凍結する。**鹿児島大学には熱帯熱マラリア原虫培養系および、同原虫の蚊への感染実験が行えないため、貴研究所にて実施する**。具体的には、熱研対応教員によってあらかじめ同調培養した熱帯熱マラリア原虫を *in vitro* 培養していただく。申請者らが訪問し、銅板及び金箔の間に新鮮なマラリア原虫や感染赤血球をはさみ、液体窒素に浸漬・急速凍結する。液体窒素保存容器に入れた状態で鹿児島大学へ移送し、炭素(C)及び白金(Pt)でできた薄膜へ蒸着することで細胞膜上の脂質分子を固定し、レプリカ薄膜を作る。

② 脂質プローブを用いたマラリア原虫レプリカ標識

脂質プローブ(GM3、PtdIns(4)P、PtdIns(4,5)P₂、PtdIns(3)P、PS に対するもの)を順次、レプリカ薄膜に反応させる。さらにこれらプローブを、金コロイド結合抗体により可視化し、電子顕微鏡により観察する。赤血球膜だけでなく、原虫の細胞内小器官、原虫の細胞膜、寄生胞膜及びマウレル裂の脂質構成とその局在についても解析する。特に、**その形態の詳細がよくわかっている単離・精製したメロゾイトにおいてその微細構造と GM3 の局在を詳細に検討することによりラフトの関与を検討する**。また、熱帯熱マラリア原虫を蚊へ感染させて得られる運動性のオーキネートとスポロゾイトについての解析と比較も予定する。

③ マラリア原虫と感染赤血球における膜構成蛋白質の局在解析

膜脂質の局在にならび、レプリカ薄膜を対象として原虫由来蛋白質の局在解析も行う。特に、マラリア原虫が感染赤血球内に新たに構築する膜構造であるマウレル裂に局在する蛋白質の多くについて、細胞外領域が赤血球細胞質内なのか、マウレル裂内なのか、その方向が不明であり、機能予測が困難である。これまで解析が困難であった、これらの謎を本方法で明らかにすることが期待できる。**熱研対応教員は SBP1 や MAHRP2 といったマウレル裂局在蛋白質に Myc タグ標識をした組換え原虫を保有しており、解析を行うことができる**。また、哺乳類細胞とは異なる GM3 の膜局在など、マラリア原虫に特有の現象の背景を理解するために、細胞膜の内側と外側でのリン脂質の反転をつかさどるスクランブラーゼを欠損させた原虫における局在も検討する

③ 予想される成果

マalaria原虫と感染赤血球の細胞膜構成脂質の局在を明らかにすることで、これまでの蛋白質を対象とした研究から得られた知見に、新たに脂質の情報を追加することができる。赤血球膜構成蛋白質の解析結果とあわせることで、膜構造変化メカニズムの詳細を明らかにしていくうえで大きな手がかりを提供しうる。特に、運動性のあるメロゾイト、オーキネート、スポロゾイトに特徴的な細胞内器官における膜構成脂質の局在は明らかにすることで、運動性にラフトが関与するとのモデルの検証を行うことができる。さらに、感染赤血球内に構築される原虫由来の膜構造物における原虫由来蛋白質の詳細な局在は不明なものが多い。特に機能が不明であるが、マウレル裂形成に重要な役割を果たしていることが知られている蛋白質(SBP1 や MAHRP2)のマウレル裂における局在を明らかにすることで、その機能の推定にも役立つ情報が得られる。最後に、これまでの研究で見出したマalaria原虫特有の膜構成脂質の局在を司る分子を明らかにすることで、新たな創薬起点を見出すことも期待できる。

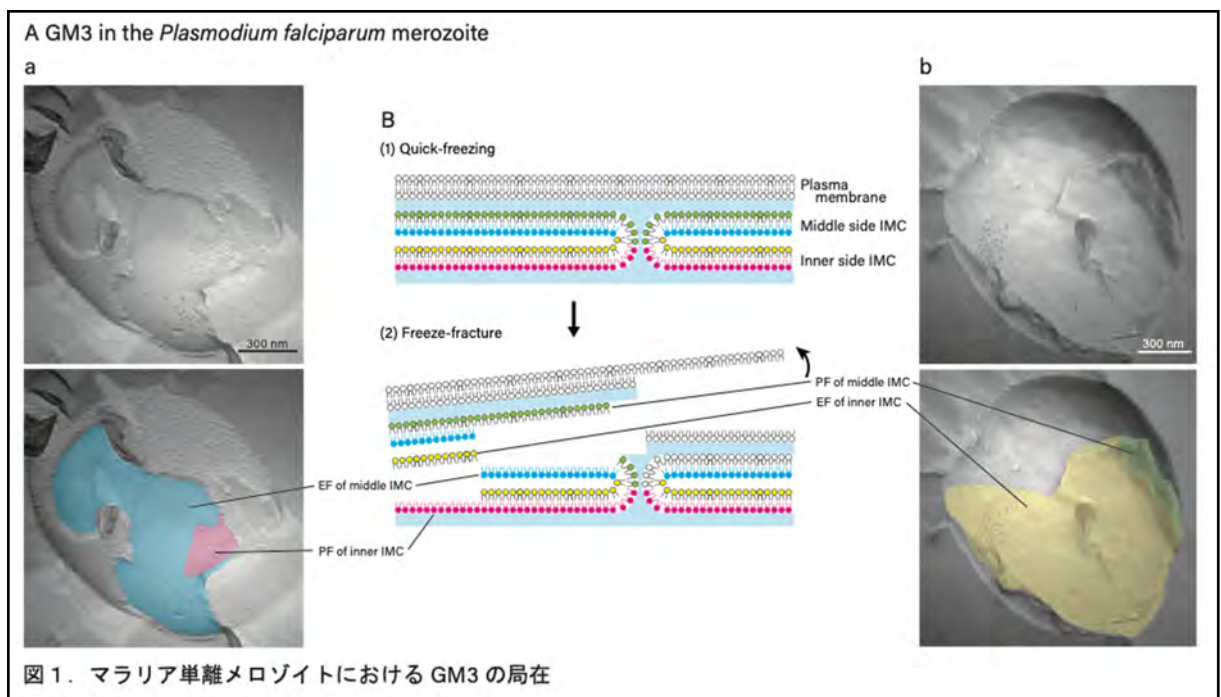
5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

マラリア原虫（Dd2 株：パラシテミア8.03%）感染赤血球からメロゾイトを単離し遠心・洗浄した。あらかじめ紙やすりで表面を粗にした金箔及び銅箔で感染血球を挟み、液体窒素で十分冷却した急速凍結装置ではさみ、液体窒素に浸漬することで急速凍結した。液体窒素内で保存しつつ鹿児島大学へ移動し、真空蒸着装置内で割断したのち、ただちに炭素および白金を蒸着しレプリカを作成した。レプリカ薄膜に、真核生物ラフトマーカであるGM3を標識するプローブを反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。ホスファチジルイノシトール4-リン酸（PtdIns(4)P）およびホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸（PtdIns(4,5)P₂）はともにイノシトールリン脂質に分類される。PtdIns(4,5)P₂は細胞膜を構成するだけでなく、シグナル伝達など生理学的な機能をもつ。PtdIns(4)PはPtdIns(4,5)P₂の前駆体であり、ゴルジ装置や細胞膜に存在し脂質輸送などに関わる。原虫寄生赤血球レプリカ薄膜に、これら脂質を標識するプローブを反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。

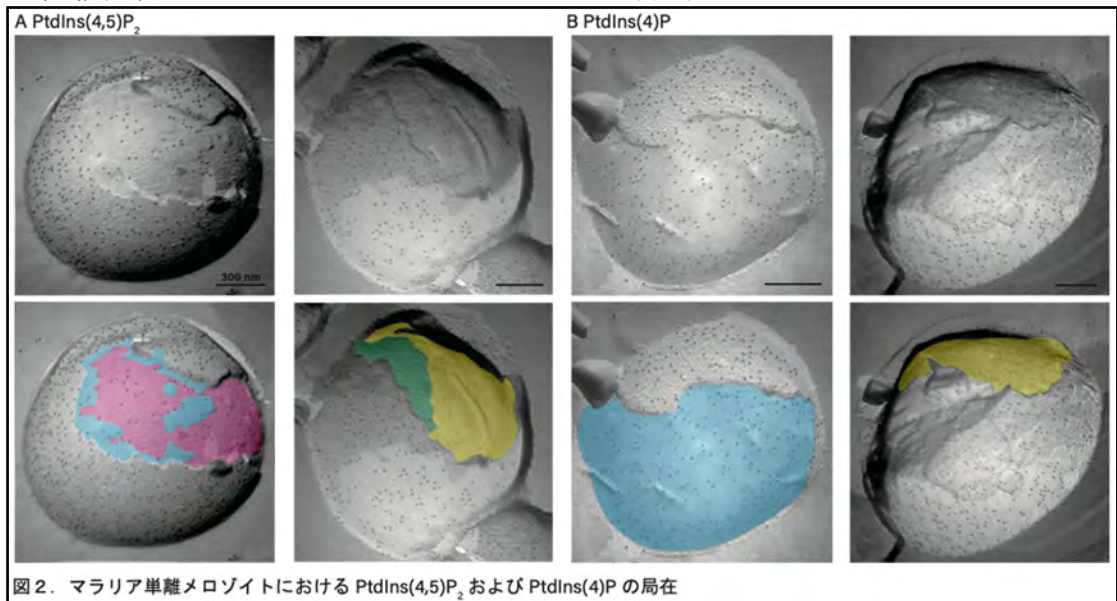
② 成果（結果+考察）

以前、我々は脂質ラフトの主要成分である糖脂質 GM3 が感染赤血球内のマラリア原虫において細胞膜の外葉（E-face, EF）および内葉（P-face, PF）に局在することを見出した（Koudatsu et al., Sci. Rep. 2021）。本研究において、単離・培養したメロゾイトにおいては、GM3は細胞膜のEFおよびPFには局在せず、細胞膜の直下に局在する inner membrane complex (IMC)膜のEFのみに局在することがわかった（図1）。*Plasmodium falciparum* や



Toxoplasma gondii が属する Apicomplexan 属では原虫の運動に重要な役割を持つ

glideosome が IMC のラフトに局在し、その IMC のラフト自身が原虫の運動に関与することが知られている。我々は以前、*P. falciparum* の単離メロゾイトが gliding 運動を行なっていることを報告した (Yahata et al., PNAS, 2021)。このことは単離メロゾイトの IMC にラフトが局在するという今回の発見とよく一致する。また以前、我々は感染赤血球のシズント内のメロゾイトでは GM3 は細胞膜の PF および EF にも局在することを報告しており (Koudatsu et al., Sci. Rep. 2021)、本研究において発見したように単離・培養したメロゾイトでは GM3 は細胞膜の EF および PF には局在しないことと異なる。現在、この結果の違いについては検討中である。また、哺乳類細胞などでは主に細胞膜の PF に局在するホスホイノシタイドである



PtdIns(4,5)P₂ および PtdIns(4)P は、シズント内のメロゾイトでは哺乳類と同様に細胞膜の PF に局在することを我々は以前に報告した (Koudatsu et al., Sci. Rep. 2021)。しかしながら、培養単離メロゾイトでは、PtdIns(4,5)P₂ は細胞膜および IMC 膜の PF と共に EF にも局在することが本研究でわかった (図 2)。PtdIns(4,5)P₂ はホスホリパーゼ C (PLC) の基質となり、イノシトール 3 リン酸 (InsP₃) とジアシルグリセロール (DAG) を産生し、それぞれ小胞体から Ca²⁺ の放出とプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化に関与する。我々は以前の報告 (Yahata et al., PNAS, 2021) で PLC を阻害すると gliding 運動が抑制されることを報告しており、本研究で明らかにした、PLC の基質の PtdIns(4,5)P₂ がメロゾイトの生体膜に局在することとよく一致する。

③ 成果の公表

【学会発表】

向達汐美、正谷達膳、小西里可子、黒川夕奈、山口優希、富奥甘奈、福田佳代子、Hakimi Hassan、麻田正仁、金子修、藤田秋一

ヒト malaria 原虫 *Plasmodium falciparum* の細胞膜ではラフト主成分の糖脂質 GM3 は内葉と外葉の両方に局在する, 第 94 回 日本生化学大会, 2022 年 11 月 9 日

6. 自己評価

2022年度の前半は新型コロナウイルス感染蔓延により、当初数回予定していた熱帯医学研究所への訪問と材料作製が一回のみとなり、計画通りの実験を行えなかった。しかし、現在までに実験結果を解析しある程度の結果を得ることができた。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：原虫に共生するウイルスおよびウイルス・原虫間相互作用に関する因子の探索

課題番号：2022-Ippan-32

2. 代表者：大阪大学微生物病研究所 助教・七戸 新太郎

3. 決定額：350 千円

4. 研究計画

① 研究目的

1980年代に腫トリコモナスから共生ウイルスが発見（Wang and Wang, PNAS, 1986）されて以来、ランブル鞭毛虫（Miller et al., Mol Biochem Parasitol., 1988）やリーシュマニア（Tarr et al., PNAS, 1988）などの病原性原虫に共生するウイルスが発見されてきた。近年、ゲノムシーケンサーの急速な発展により、これまで知られていなかったウイルスが病原性微生物内やさまざまな環境中に存在することが明らかになってきた（Paez-Espino et al., Nature, 2016）。原虫共生ウイルス発見の頻度は年々増しており、最近では三日熱マラリア原虫（Charon et al., PLoS Pathog., 2019）やブレコモナス（Grybchuk et al., mBio, 2018）からも新たなウイルスが見つかった。原虫ウイルスは *Totiviridae* 科もしくは *Partitiviridae* 科のいずれか属するもののみであったが、この2科に分類できない原虫ウイルスも発見されており、原虫との共進化を遂げて多様化している可能性が示唆される。形態的な差異に乏しい原虫種においては、共生ウイルスをタイピングの指標として提案することが期待できる。

原虫ウイルスに関する研究の多くは遺伝子配列を報告したものが多く、原虫ウイルスの機能や宿主原虫との関係性について言及された例はまだ少ない。一部のリーシュマニア（*Leishmania guyanensis* 等）に共生するウイルス（LRV2）はリーシュマニアの病原性を増強することが知られている（Ives et al., Science, 2011）。腫トリコモナスに共生するウイルス（TVV）やランブル鞭毛虫に共生するウイルス（GLV）は原虫表面の接着分子の発現量を変化させることが知られているが、これが原虫の病原性や生理学的性状に与える影響は十分に明らかになっていない。TVV や GLV に限らず、他の原虫ウイルスにおいても原虫へ与える影響が明らかになっている例は少数である。また「6. 研究経過」に記すように、我々も新規原虫ウイルスを検出しているが、その機能や宿主原虫との関係性、病原性への影響はまだ明らかになっていない。本研究結果を基に、共生ウイルスによる病原性増強機構の解明や、共生ウイルスを標的とした抗原虫薬の開発といった新しい医学的研究課題にも展開できる可能性がある。

本研究では、以下の2つを目的として研究を実施する。

A. 新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

熱研生物資源室（NBRC）や他の研究機関に保管されている原虫株から DNA・RNA ウイルスを網羅的に探索することによって、原虫に共生するウイルスの多様性を明らかにしていく。特に鞭毛虫類の原虫種には注力したい。たとえば、クルーズトリパノソーマは NBRC で数多くの株が保存されている原虫種の 1 つであるが、共生するウイルスが見つければ、現在の 6 タイプに分類される遺伝子型を見直すタイピング指標になる可能性がある。臈トリコモナスやリーシュマニア、ランブル鞭毛虫では既にウイルス発見例があるものの、産地と採集年月日の情報が付与されている NBRC 株を用いて追加で新規ウイルスを検出できれば、そのウイルスゲノムの進化系統解析データと原虫株の産地情報と合わせた時空間的解析が可能となる。原虫ウイルスの分類体系を整理する材料になるばかりか、原虫とウイルスとの共進化過程を探る手掛かりになる。

B.オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

これまでに発見した原虫ウイルスを感染させたり、あるいは抗ウイルス薬を用いて、ウイルス感染原虫とウイルス脱落原虫を作製し、オミックス解析（トランスクリプトーム・プロテオーム）を行うことで、ウイルス感染によって変動する原虫の遺伝子・タンパク質を明らかにする。網羅的に手がかりを探索することで、ウイルスが原虫を制御する因子あるいは抗ウイルス応答に寄与する原虫因子を見出す。このようにウイルス・原虫間相互作用を調べることで、ウイルスと原虫の共進化あるいは単細胞の真核生物における新たな抗ウイルス戦略と言った生物学的課題の解明に展開できる可能性がある。また、共生ウイルスと病原性に関する新知見、共生ウイルスを標的とした抗原虫薬の開発といった医学的課題への展開も期待できる。

② 研究内容

A.新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

次世代シーケンサー解析（NGS）でウイルスゲノムを探索する際に問題となるのは宿主ゲノムの混入である。宿主ゲノムは微生物ゲノムと比べ量が多いため、微量のウイルスゲノムはシーケンシングで検出できない。したがって、ウイルスゲノムを特異的に検出もしくは宿主ゲノムを除去する必要がある。これまでに DNA ウイルスはショットガン NGS 解析をウイルス精製や宿主 DNA の分解などと組み合わせることで感度を高められてきた。一方、RNA ウイルスは、dsRNA を検出する FLDS（Urayama et al., *Microbes and Environments*, 2016）の開発によって高感度にウイルスゲノムを検出することに成功している。対象とする原虫株は熱研 NBRC に保管されている病原原虫株、また他機関にも分与依頼を行って収集する。また、申請者らのこれまでの研究では、FLDS を用いた RNA ウイルスのみに着手していたが、本研究では DNA ウイルスについても探索を行う。原虫ウイルスはこれまで RNA ウイルス、特に dsRNA をゲノムとして持つものが多く見つかっていたが、最近の研究において、ランブル鞭毛虫や赤痢アメーバゲノムに一本鎖環状 DNA（Circular Rep-Encoding Single-Stranded; CRESS）ウイルスも存在していることが示唆された（Kinsella et al., *Nat commun.*, 2020）。本研究でこれまでに解析してきたランブル鞭毛虫についても、CRESS ウイルスが存在するかを調べるため、現在全ゲノムシーケンスを行っている。

NBRC で保管されている原虫を培養し、ウイルス探索のための試料を準備する。RNA ウイルスは FLDS で検出および全長配列を決定する。一方、DNA ウイルスはショートリード (Miseq) とロングリード (Nanopore) シーケンスを組み合わせながら、遊離したウイルスとゲノムに組み込まれたウイルスについて、網羅的な検出を試みる。得られたウイルスゲノム配列とデータベースの配列を用いて、ウイルスゲノムの配列解析および遺伝子系統解析を行い、これまで報告されている原虫ウイルスとの類縁関係について明らかにする。また、宿主の遺伝子型、産地、採集日時、その他性状情報を勘案し、原虫とウイルスの共進化について検討する。

七戸と風間は高感度 RNA ウイルス検出法である FLDS を用いて、すでに新規ウイルスを 6 種類発見しており、十分な連携が取れている。臙トリコモナスやランブル鞭毛虫に限らず熱研 NBRC では 300 株以上の原虫が提供可能な状態で保存されており、網羅的にウイルス探索を行うことによって、他の原虫種においても新たなウイルスが見つかる可能性がある。昨年度に本研究課題に採択されてからは、培養できたトリパノソーマ、ランブル鞭毛虫の試料を随時 FLDS および DNA ショットガンシーケンスを用いて、ウイルスの検出を試みている。

B.オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

ウイルスが共生する臙トリコモナスにおいて、表面抗原 P270 の発現量が変化することが報告されている。P270 は臙トリコモナスが生殖器細胞表面に結合するために重要なタンパクとして知られており、臙トリコモナスの細胞への結合や病原性に影響すると考えられている。また、ランブル鞭毛虫において表面タンパク P100 の発現量とも関連しているとの報告がある。これらの報告は、共生ウイルスが宿主原虫に能動的に影響を及ぼしている、あるいは、原虫がウイルスを検知して反応している可能性を示している。しかし、これまでの研究では上記にも述べたように、ウイルス存在下における原虫への影響は部分的にしか解析されていない。本申請ではウイルス感染原虫のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を通して、網羅的にウイルス・原虫間相互作用に関わる因子をスクリーニングする。

これまでの我々の研究では、SGV 感染ランブル鞭毛虫から得た 12 個のクローン株において、それぞれに感染する SGV の種類と数に違いがあることを見出した。これは SGV-1~4 がそれぞれ感染様式や効率が異なる、あるいはウイルスが排除されている可能性、言い換えれば、各ウイルスに対してランブル鞭毛虫の抗ウイルス応答が存在する可能性を示唆している。しかしながら、これまでにクローン化した原虫株は、それぞれの SGV が 1 ないしは 2 種類欠損したものであった。4 つ全て欠損したクローン株、各ウイルスを保有するクローン株を作製するため、ウイルス除去とウイルス感染 (伝播) の 2 つの実験系を確立する。ウイルス除去には、リバビリンやレムデシビルなどの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼに作用する抗ウイルス薬を用いて、SGV 欠損株の作製を試みる。これに加えて、SGV 感染ランブル鞭毛虫の更なるクローン化を進めて SGVs の種類と数が異なるクローン化株の取得も続ける。一方、ウイルス感染 (伝播) 実験では、水平型共培養容器 (UniWells™) を用いて水平感染システムを構築した (図 3)。このシステムでは、培養液中に放出されるウイルス粒子やエクソソームはフィルターを通過するが、

ランブル鞭毛虫は通過できない。SGV 保有原虫からウイルスを保有しない原虫（Portland-1 株）に水平感染させる実験は終了し、現在伝播した SGV の種類について解析中である。様々な種類の SGV 保有クローンが作製でき次第、各クローンのオミックス解析を行う。

これらのオミックス解析は申請者の所属する大阪大学微生物病研究所の中央実験室に依頼する。遺伝子発現は、それぞれのクローンから RNA を回収し、RNA-Seq によって遺伝子発現量を比較する。一方、プロテオーム解析は MS 解析によって、発現タンパクの差異を調べる。これらの結果を比較することで、各 SGV とランブル鞭毛虫の相互作用に関わる因子をスクリーニングする。本研究結果から、ウイルス・原虫間相互作用の一端が明らかになり、単細胞真核生物がウイルスによってどのように進化するのか、あるいは、ウイルスに対してどのような排除機構を持つのかという生物学の根幹にある非常に重要な情報が得られる可能性を秘めている。また、得られる情報は、共生ウイルスと病原性の新たな関連性や共生ウイルスを標的とした抗原虫薬の開発といった新しい医学的研究課題につながる基盤情報となる。

③ 予想される成果

A. 新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

これまでの研究で臈トリコモナスとランブル鞭毛虫から複数の新規ウイルスが発見されていることから、その他の原虫においても新規ウイルスが発見される可能性が高い。申請者らが発見した原虫ウイルスは、*Totiviridae* 科に属するものに加えて、新規のウイルス科として定義され得るものもある。1 つの原虫種 1 つの株においても複数の多様なウイルスが見つかることを実証できたため、NBRC に保管されている多様な原虫種を調べればさらに多様なウイルスが見つかることを確信している。更に、これまでほとんどの原虫ウイルス研究においては RNA ウイルスに着目されてきたが、DNA ウイルスも発見できる可能性がある。発見したウイルスの進化系統解析データと原虫の産地情報を合わせた時空間的解析を行うことにより、共進化過程の手がかりが掴める可能性がある。また、これらの結果を基に、共生ウイルスが原虫種タイピングの指標として提案できるのではないかと期待できる。

B. オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

臈トリコモナスではクローン化した場合でも、TVV や TVsgV-1 のウイルス種数は一定であった。しかし、ランブル鞭毛虫においてはクローンによって SGV の数が異なることが明らかになった。これは SGV-1~4 がそれぞれ感染様式や効率が異なる、あるいはウイルスが排除されている可能性がある。言い換えれば、ウイルス因子が原虫の転写活性等を制御している、あるいは CRISPR のような細菌におけるウイルス（バクテリオファージ）に対する抗ウイルス応答が存在するように、原虫においてもウイルス排除機構が存在することは想像に難くない。原虫のような単細胞真核生物の抗ウイルス応答を調べることは、高等動物の新たな免疫機構を発見することにもつながる可能性がある。

本研究では SGV とランブル鞭毛虫をモデルシステムとして遺伝子・タンパク発現を網羅的に解析する。SGV とランブル鞭毛虫で起こりうる遺伝子発現の変動を見出すことで、

具体的に原虫がどのようなメカニズムで相互作用しているかについて手がかりが掴めると考えられる。得られた結果を基に、将来的に「ウイルスによる宿主細胞制御」なのか「原虫の抗ウイルス応答」なのか明らかにする研究に展開していきたい。また、将来は一部のリーシュマニアで見られるような、共生ウイルスによる病原性増強機構や、共生ウイルスを標的とした抗原虫薬の開発といった新しい医学的研究課題にも共同研究として取り組みたい。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

A.新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

- ランブル鞭毛虫より発見した新規 dsRNA ウイルス Noggi の全塩基配列を決定した。
- Noggi のゲノム構造、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ配列 (RdRp) を SGV1~4 および既知の *Totiviridae* 科ウイルスと比較した。
- 熱研生物資源室に保管されている *Trypanosoma cruzi* 単離株から long dsRNA を検出した。この結果は、*T. cruzi* に新規ウイルスが存在することを示唆している。

B.オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

- RdRp 阻害剤を用いて、ジアルジア内の SGV1~4 除去を試みたが、全 SGV を除去したクローンを樹立することはできなかった。また、様々なパターンのウイルス保持クローンを樹立できなかったことから、オミックス解析に進むことができなかった。

② 成果（結果＋考察）

A.新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

前年度にランブル鞭毛虫より発見した dsRNA ウイルス Noggi の全塩基配列を決定したところ、Noggi ゲノムには外被タンパクと RdRp の 2 つの ORF が存在し、両タンパクのコード域にはフレームシフトを伴って重なり合う領域が存在した。各配列の全長に違いがあるものの、このような構造は GLV や SGV1 と類似性が認められた。各ウイルスの類縁関係を探るために RdRp 配列の比較と試みたが、ウイルス間で差異が大きいため、信頼度の高い解析結果は未だ得られていない。

新規ウイルスと考えられる long dsRNA も発見された。熱研生物資源室に保管されている *T. cruzi* 14 株を Epimastigote で培養し、ウイルス探索を試みたところ、7 株のから約 1.6kbp の long dsRNA を検出した。本研究で使用した *T. cruzi* 単離株を表 1 にまとめた。これまでに透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた観察によって、*T. cruzi* にウイルス様粒子が存在することは報告されているが、ゲノム構造を持ったウイルスの存在については知られていない。long dsRNA はウイルスゲノムを示唆するものであり、本研究で *T. cruzi* からウイルスが見つければ世界で初めての報告となる。今後は全長配列を決定するために、RNA-seq 解析を行う予定である。

本研究で見つかった *T. cruzi* 由来 long dsRNA は、ヒト由来の分離株でもサンガメ由来の分離株でも、同サイズのバンドが検出されたため、*T. cruzi* のライフサイクルを通じて新規ウイルスを保有していると考えられる。継代培養を繰り返した Epimastigote を材料としているので、媒介昆虫に由来するウイルスである可能性は低い。現在は *in vitro* 培養系の Trypomastigote や Amastigote で新規ウイルスが保持されるか検討中である。また、long dsRNA を検出できた *T. cruzi* はいずれもグアテマラで分離された株であった。他の地域に由来する分離株からは検出されていない。そのため、限定的な地域に固有のウイルスである可能性がある。グアテマラを含む中米域は心臓寄生による強毒性の症状が高頻度に見られる地域であり、南米や他地域に由来する分離株を用いた精査、病原性との関係にも関心が寄せられる。

表 1. ウイルスゲノムを探索した熱研生物資源室に保管されている *T. cruzi* の単離株

株	dsRNA	形態	分離源	分離国	文献
Colombia	not detected	Epimastigote	Human	Colombia	1
HN274	single band (1.6 Kbp)	Epimastigote	Human	Guatemala	2
H7	single band (1.6 Kbp)	Epimastigote	Human	Guatemala	2, 3, 4, 5
St.5	not detected	Epimastigote	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	6
TM6	single band (1.6 Kbp)	Epimastigote	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	2, 3, 4, 5
TM10	single band (1.6 Kbp)	Epimastigote	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	2, 3, 4, 5
TM21	single band (1.6 Kbp)	Epimastigote	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	2, 3, 4, 5
TM23	single band (1.6 Kbp)	Epimastigote	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	2, 3, 4, 5
TM30	not detected	Epimastigote	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	2, 3, 4, 5
Tulahuen	not detected	Epimastigote	<i>Triatoma infestans</i>	Chile	1
Y	not detected	Epimastigote	Human	Brazil	1
Waz	not detected	Epimastigote	不明	不明	
171	not detected	Epimastigote	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	6
172	single band (1.6 Kbp)	Epimastigote	<i>Triatoma dimidiata</i>	Guatemala	2, 3, 4, 5

1. WHO, Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series no 905. World Health Organization, Geneva2002

2. Higo et al., Int. J. Parasitol., 1997, 27, 1369-74.

3. De Leon et al., Int. J. Parasitol., 1998, 28, 1867-74.

4. Higo et al., Parasitology, 2000, 121, 403-8.

5. Higo et al., Parasitol. Int., 2004, 53, 337-44.

6. Iwagami et al., Parasitol Res., 2007, 102, 129-134

③ 成果の公表

1. 風間真, 泉山信司, 浦山俊一, 高木善弘, 布浦拓郎, 七戸新太郎. ランブル鞭毛虫から検出された5種類のRNAウイルス. 第92回日本寄生虫学会大会. 2023年3月30-31日. 金沢歌劇座, 石川県金沢市.

6. 自己評価

今回の試験では、RdRp 阻害剤を用いたウイルス除去試験でもウイルス除去には至らなかったが、薬剤濃度の調整などの試験条件で検討の余地がある。また、抗ウイルス効果のある化合物ライブラリーなどを用いることも検討する必要があるかもしれない。このように、ウイルス感染・非感染ランブル鞭毛虫クローンの確立に苦慮しているが、このボトルネックを突破できれば、ウイルス・ランブル鞭毛虫間相互作用に関する研究に展開できるため、様々な手法を駆使して解決していきたい。

一方で、熱研生物資源室に保管されている *T. cruzi* から long dsRNA を検出した。現在この RNA の全長配列決定を試みている。これまでに *T. cruzi* 内にウイルス様粒子が存在することを示唆した文献は 2 報あるが、実際にウイルスゲノムの同定や分類、および機能は明らかにされていない。*T. cruzi* はシャーガス病の原因となる原虫であり、世界中で 600~700 万人が罹患していると推定されている。*T. cruzi* とウイルスの相互作用が明らかになれば、シャーガス病のこれまでに知られていない側面が明らかになる可能性があるため、今後の研究の展開が期待される。

このように本研究では課題は残るものの、次の研究に展開するために一応の成果は出せたと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：熱帯由来感染症に対する新薬開発を指向した微生物二次代謝産物の網羅的探索および単離・構造決定
課 題 番 号：2022-Ippan-33
2. 代 表 者：広島大学大学院統合生命科学研究科・准教授・荒川賢治
共 同 研 究 者：広島大学大学院統合生命科学研究科・大学院生・平田朝陽
広島大学大学院統合生命科学研究科・研究員（学部4年生）・秋元萌々子
広島大学大学院統合生命科学研究科・大学院生・Rukman Muslimin
名古屋大学生命農学研究科・特別研究員PD・手島愛子
長崎大学熱帯医学研究所・准教授・水上修作
長崎大学熱帯医学研究所・教授・平山謙二
長崎大学熱帯医学研究所・准教授・稲岡健ダニエル
長崎大学熱帯医学研究所・特任研究員・Awet Alem Teklemichael
長崎大学熱帯医学研究所・技能補佐員・谷口真由美
長崎大学熱帯医学研究所・大学院生・田山雄基

3. 決 定 額：300千円

4. 研究計画

① 研究目的

微生物は顕著な生理活性作用をもつ天然有機化合物の宝庫であるが、新規化合物の報告例は年々減少傾向にあり、耐性菌対策なども含め、我々の健康長寿の維持増進に資するためには、**生物資源の持続的拡大**が必要不可欠である。

生物資源の持続的拡大に際し、必要不可欠な目標は「いかに新規骨格を有する未知生理活性物質を獲得できるか」となる。多様な生理活性物質を生産する土壌微生物・放線菌も例外に漏れず、単離報告例は頭打ちになっている。放線菌は**1株あたり30種類以上の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを有する**が、通常培養条件で発酵生産が認められるのは1-2割程度であるため、**約8割はゲノムの中に「埋もれている」といえる**。本研究では、その眠った生物資源の覚醒技法（ゲノムマイニングと呼ばれる）の確立を目指し、**シグナル分子の代謝誘導系を利用した天然物探索法の開発**を提案する。

さらに本研究では、**放線菌二次代謝産物ライブラリーの徹底的利活用による新たな感染症制御分子の創出**を目指す。熱帯熱マラリアおよびシャーガス病を対象疾患とし、放線菌二次代謝産物ライブラリーの熱帯熱マラリア原虫・トリパノソーマ原虫に対する生物活性試験を遂行し、新薬創出につながるような知見の獲得を目指す。

② 研究内容

[課題1] SRB型シグナル分子による休眠二次代謝遺伝子の発現誘導および代謝産物の構造解析

シグナル分子は二次代謝生産における重要な鍵物質であるにもかかわらず、ほとんどの菌株において構造不明(12菌株 23種類の報告例のみ)であり、汎用性誘導因子としての分子基盤が未整備である。そこで、二次代謝誘導におけるシグナル分子SRBの汎用性を見いだすべく、各種単離株もしくは分離前の菌叢に対してSRBを添加し、非添加サンプルとのTLCおよびHPLCの比較解析を行う。添加有無による代謝プロファイル変化が見られた場合、代謝産物の構造解析に着手する。これにより、誘導分子存在下でのみ生産しうる二次代謝産物の獲得が期待できる。

なお、2021年度一般共同研究において、67株のSRB添加および非添加の培養抽出液(計134サンプル)を調製し、課題2において抗マラリア活性に賦した。本年度は残りの微生物株(100株程度)におけるSRB誘導二次代謝ライブラリーの構築を進める。

[課題2] 熱帯由来感染症を指標にした新規感染症治療薬の探索および開発

課題1にて得られる二次代謝産物ライブラリーを用い、新たな抗トリパノソーマ薬・抗マラリア薬探索のための感染症治療薬スクリーニングを行う。なお2022年度は、顧みられない熱帯病(NTD)に含まれており治療薬も少ない抗トリパノソーマ薬の探索を優先して行う。熱帯病感染制御分子の網羅的スクリーニング遂行に関しては、熱帯病に習熟した研究者との共同研究体制が必要不可欠である。対応教員をはじめとした、熱帯医学研究所に所属する本研究参加者はこれまでに対象疾患に関連した多くの創薬研究を行っており、本課題における共同研究者に適任である。

具体的には、課題1にて調製した放線菌二次代謝産物ライブラリーをトリパノソーマ原虫を感染させたマウス心筋細胞に添加培養することにより、細胞内に潜伏するアマスティゴート型原虫に対する抗原虫活性を評価する。事前にマウス心筋細胞の培養抽出物に対する50%生存率(CC50)を評価することで、活性評価物質の動物細胞毒性を抗原虫活性と明確に区別すべく予備実験を実施する。本研究の実験には、ルシフェラーゼ発現原虫を用いる。培養抽出物処理後に、ルシフェラーゼに対する基質を含む溶解バッファーを用いた原虫破碎とルシフェラーゼ活性測定を行う。その結果を陽性・陰性コントロールと比較し、原虫阻害率を計算する。まずは一定濃度での検討を行い、阻害率が高かった抽出物に関しては、50%阻害率(IC50)の決定を行う。

研究経過でも示した通り、2021年度は67株のSRB添加および非添加の培養抽出液(計134サンプル)のうち、34サンプルにおいて顕著な抗マラリア活性を呈し、なおかつ細胞傷害性を示さなかった。誘導分子SRBの有無にかかわらず抗マラリア活性を呈する培養抽出液に関しては、誘導分子非依存的な抗マラリア活性化合物の蓄積が示唆される。そこで該当株の大量培養を行い、次いでSephadex LH20ゲル濾過、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC分取などを駆使して活性化合物の単離を行い、

ESI-MS, NMR などの分光機器を用いて構造決定を達成する。なお、活性検出を組み合わせながら単離精製を行っていくため、長崎大学・広島大学の密接な共同研究体制によって初めて達成できる研究内容となっている。

③ 予想される成果（申請書「8. 予想される結果」を転記）

生物資源の遺伝情報の中には**眠った医薬シーズの存在**が示唆され、健康長寿や農林水産業、環境保全など「持続可能な開発目標 (SDGs)」への還元が期待される。本研究では「シグナル分子 SRB の添加有無」の比較プロファイル解析に焦点を当てるため、**通常培養非生産の休眠二次代謝産物の検出と生物活性評価**が可能となる。新薬の開発本手法は、シグナル分子の系外からの添加に基づくため、**遺伝子組換えを要しない二次代謝誘導システム**である。このことは、屋外（開放系）試験が非制限であることを示しており、海外を含めた大規模利用が可能である。なお、課題1「シグナル分子による代謝活性化」に用いる SRB は、我々が世界で初めて見いだしたブテノライド型シグナル分子であり、従来のシグナル分子（図1）と構造が異なる。我々は、SRB に関する構造特性や生化学的性質、さらに誘導体を含めた合成経路を確立しており、他グループの追随を許していない。将来的には、**微生物分離源の開拓**にて新規性の高い放線菌群を単離し、それらの**休眠二次代謝の活性化**を組み合わせる、という相乗効果により、新規化合物獲得の可能性が指数関数的に増強できる。その結果、課題2にて新薬候補となる抗原虫活性を有する新規化合物が見いだされることが大いに期待できる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

研究材料

- ・広島大学菌株保存施設(HUT)保存株を中心とした *Streptomyces* 属放線菌 67 株
- ・そのうち、 $IC_{50} < 10 \mu M$ を呈する 2 株
- ・シグナル分子 SRB の誘導体 C8-SRB（図1）

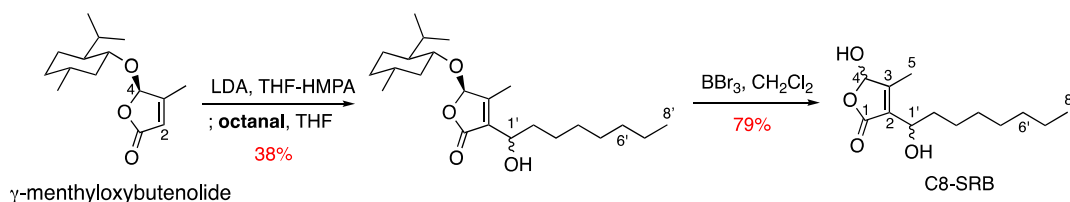


図1. C8-SRB の合成スキーム

活性試験

- ・抗マラリア活性試験
- ・細胞傷害性試験

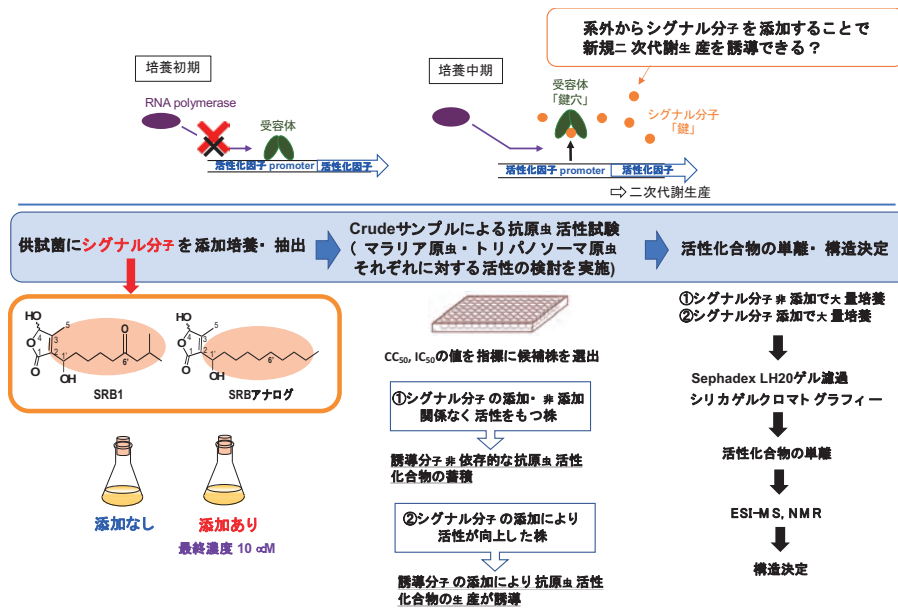


図 2. 本研究のアウトライン

② 成果 (結果 + 考察)

IC₅₀ < 10 μM を呈する 2 株に絞って精製・解析を進めた。まず、6 liter スケールにて培養を行い、酢酸エチルによる抽出、Sephadex LH20 によるゲル濾過精製、シリカゲルカラム精製を行った。図 3 にゲル濾過精製の実験データを記載する。Fraction 8, 10-16 に活性画分があることを明らかにできた。シリカゲルカラム精製においても、同様に抗マラリア活性試験、細胞障害試験を組み合わせ、抗マラリア化合物の単離・構造決定を目指している。

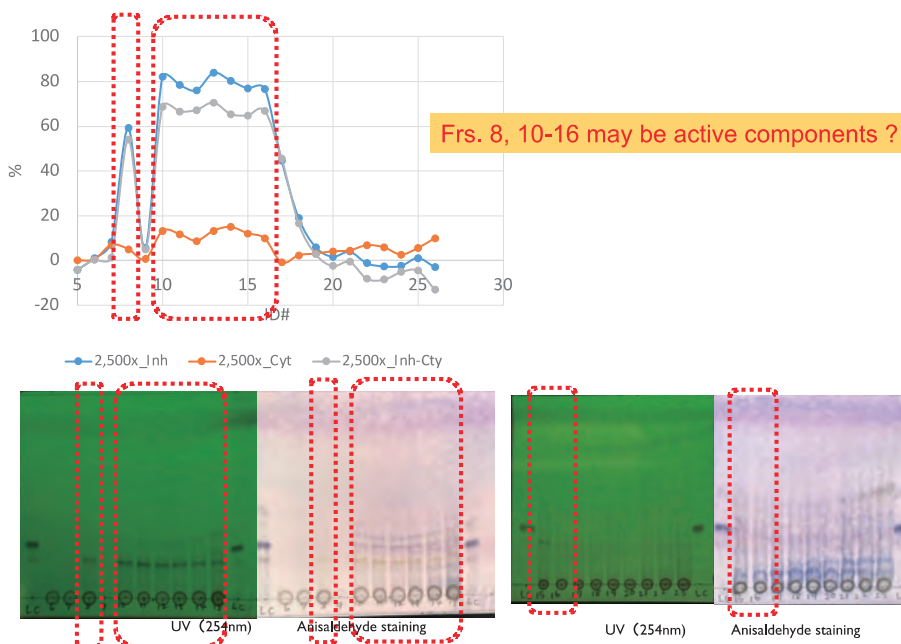


図 3. Sephadex LH20 ゲル濾過画分と抗マラリア活性試験

③ 成果の公表

【学会発表 1 件】

(1) 日本農芸化学会 2023 年度大会（広島）2023/3/14-3/17（オンライン）

「抗マラリア原虫活性化合物開発を指向したシグナル分子誘導ゲノムマイニング」
平田 朝陽, 手島 愛子, 秋元 萌々子, Awet Alem Teklemichael, 谷口 真由美,
水上 修作, 荒川 賢治 (2023/3/14; 1F04-08)

また、今後の展開を含めた成果公表の予定については、次項「6. 自己評価」にて記載する。

6. 自己評価

研究経過でも示した通り、2021, 2022 年度は **67 株の SRB 添加および非添加の培養抽出液(計 134 サンプル)**のうち、**34 サンプルにおいて顕著な抗マラリア活性を呈し、なおかつ細胞傷害性を示さなかった**。誘導分子 SRB の有無にかかわらず抗マラリア活性を呈する培養抽出液に関しては、誘導分子非依存的な抗マラリア活性化合物の蓄積が示唆される。そこで該当株の大量培養を行い、次いで Sephadex LH20 ゲル濾過、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC 分取などを駆使して活性化合物の単離を行い、ESI-MS, NMR などの分光機器を用いて構造決定を達成する。本報告書記載の 2022 年度解析において、2 株における活性成分の構造決定を進めており、現在化学合成を駆使した構造確認を行っている。現在抗マラリア活性試験のスクリーニングに関する研究成果を論文執筆中 (Teklemichael, Teshima, *et al.*) であり、また 2023 年 3 月の日本農芸化学会大会にて発表した(「抗マラリア原虫活性化合物開発を指向したシグナル分子誘導ゲノムマイニング」、平田ほか)。2023 年度採択された課題では、2021, 2022 年度一般共同研究にて得られた活性サンプルの解析も進め、活性本体の構造決定を行い、論文公表やさらなる学会発表を行う予定である。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由(「6. 自己評価」で述べてあれば省略可)

令和4（2022）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：マンソン住血吸虫のミトコンドリア硫黄代謝に関する研究
課 題 番 号：2022-Ippan-35
2. 代 表 者：（帯広畜産大学 原虫病研究センター・教授）河津信一郎
共 同 研 究 者：（帯広畜産大学 共同獣医学科・学生）直田 紗希
（帯広畜産大学 共同獣医学科・学生）篠崎 夏歩
（分子感染ダイナミクス解析分野・准教授）稲岡健 ダニエル
（寄生虫学分野・教授）濱野 真二郎
（感染生化学分野・教授）北 潔

3. 決 定 額：350 千円

4. 研究計画

① 研究目的

マンソン住血吸虫症はアフリカ、中東、カリブ海沿岸、南米など世界各地で流行が認められる寄生虫病で、世界保健機関（WHO）はこの病気を顧みられない熱帯病に指定して、積極的な対策を推進している。この寄生虫病の治療にはプラジカンテル（PZQ）が第一選択薬として用いられ、WHOは、PZQ単剤による集団治療（Mass Drug Administration: MDA）を、この寄生虫病の途上国からの排除に向けた対策として推奨しまた推進している。一方、単剤による化学療法には常に耐性の出現がともなうため、新規の住血吸虫症治療薬の開発が求められている。本共同研究では、マンソン住血吸虫のミトコンドリア硫黄代謝において主要な役割を担うと予想されるSmSUOXを研究対象とし、組換え体SmSUOX（rSmSUOX）を大腸菌で大量発現・精製し、創薬探索研究の基礎となる生化学的解析および、生活環における発現プロファイル解析を行う事を目的とする。

② 研究内容

rSmSUOX 標品の精製：

（1）SmSUOX（ID: Smp_048310）配列を大腸菌で発現するためにコドン最適化した合成遺伝子を、発現用プラスミド（pET151 および pET101）にクローニングする。

（2）His タグの位置（N 末/C 末）が精製および酵素活性に与える影響を明らかにする。また、rSmSUOX 発現に適した大腸菌株を決定し、詳細な発現誘導条件（培地、添加物、温度など）と精製条件（細胞破碎法、Ni/Co レジン、溶出・タグ切断）を検討し、rSmSUOX を大量に精製する（5 mg 以上）。

（3）精製した rSmSUOX を遠心限外濾過デバイス（アミコン）で濃縮し、タンパク質濃度を BCA タンパク質アッセイで定量する。精製標品の純度を、SDS ポリアクリルアミド電気泳動法で評価する。

rSmSUOX 標品の酵素活性測定：

(1) rSmSUOX の酵素活性を $[\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} + 2(\text{cyt c})_{\text{ox}} \rightleftharpoons \text{SO}_4^{2-} + 2(\text{cyt c})_{\text{red}} + 2\text{H}^+]$ (Qiu JA. *et al.*, 2010) を参考にして測定する。具体的には、HEPES (pH7.6) 溶液中で亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) を基質として、cytochrome c への電子の伝達 (還元) を分光光度計 (OD 550nm) で測定する。反応系に添加する酵素量に基づいて比活性を算出する。

(2) 精製 rSmSUOX を用いて、最適温度、最適 pH、基質の $K_m/V_{\text{max}}/K_{\text{cat}}$ などの基礎的な生化学的なデータを測定する。

Qiu, JA. *et al.*, The Structures of the C185S and C185A Mutants of Sulfite Oxidase Reveal Rearrangement of the Active Site. *Biochemistry* 49: 3989–4000 (2010) DOI: 10.1021/bi1001954

SmSUOX の発現プロファイル解析：

(1) 発注してある SmSUOX のペプチド抗体が rSmSUOX と反応しなかった場合、精製酵素をウサギに免疫して抗血清を作製し、SmSUOX に対する抗体を得る。

(2) 抗 SmSUOX 抗体を用いて、マ Manson 住血吸虫の生活環 (貝体内、セルカリア及び哺乳類宿主体内) 各ステージにおける SUOX の時空間的発現 (発現時期と発現部位) プロファイルを解析する。

③ 予想される成果

本共同研究を進める事で予想される結果として、住血吸虫が生物の生存に不適な高濃度 $\text{H}_2\text{S}/\text{SO}_3^{2-}$ 環境への適応を可能にした寄生適応戦略の新たな知見が得られるうえに、SmSUOX に係る基礎解析データの取得が新規抗寄生虫薬開発に繋がる事が大いに期待できる。また、生物学的には、住血吸虫の各宿主環境適応機構における硫黄代謝の意義と SUOX の役割を理解し、寄生戦略における新しい知見を得ることが期待できる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

（1）マ Manson 住血吸虫の SUOX（SmSUOX）アミノ酸配列（Smp_048310）を大腸菌コドンに最適化した遺伝子を合成して、組換え体タンパク質（rSmSUOX）標品の発現・精製系を構築した。

（2）rSmSUOX 標品を用いて、基質となる sulfite 及び、電子受容体となる cytochrome *c* に対する最大反応速度 V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) 及びミカエリス定数 K_m (μM) 値を、酵素の至適温度及び pH 条件下で決定した。

（3）rSmSUOX 標品を用いて、チオ硫酸 ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$) の SUOX 活性阻害作用を検証した。

② 成果（結果+考察）

【結果】

（1）rSmSUOX 標品の発現と精製

C 末端に His x10 タグを融合した SmSUOX 組換え体タンパク質（rSmSUOX）を大腸菌 NiCo21(DE3)株で過剰発現し、Ni-NTA アガロースとキチン樹脂を用いて精製した。発現の条件を最適化することで、1L の培養液あたり 3.7 mg のピンク色に着色

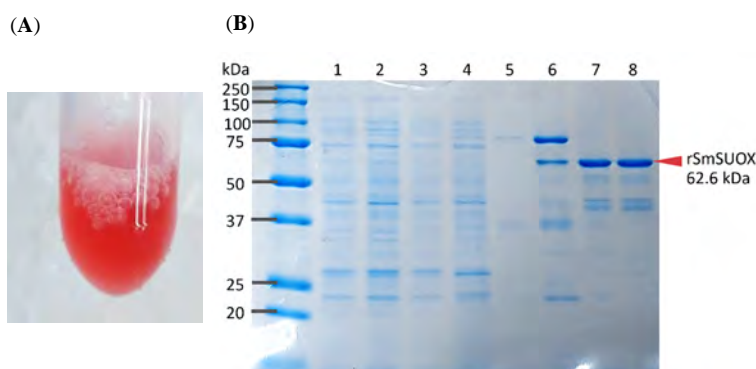


Figure 1. Purification of recombinant SUOX (rSmSUOX). (A) Purified rSmSUOX showing its pinkish color indicating proper incorporation of heme *b* into the mature enzyme. (B) Fractions collected from each purification step were separated by SDS-PAGE. M: protein marker; 1: cytosolic fraction (1 μg); 2: flow through from Ni-NTA (1 μg); 3: 10 mM imidazole wash (1 μg); 4: ATP/Mg²⁺ wash (1 μg); 5: 15 mM imidazole wash (0.12 μg); 6: 50 mM imidazole wash (0.75 μg); 7: 300 mM imidazole elution (1 μg); 8: concentrated flow-through from Chitin column (1 μg).

した rSmSUOX を精製することができた

(Figure 1A)。また、細胞質画分に占める全活性の精製収率は 30.8%であった (Table 1)。精製された rSmSUOX の活性 (24.9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) は、細胞質画分の活性 (0.36 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) と比較して 69.7 倍に上昇していた。rSmSUOX の精製度は、SDS-PAGE で

の評価で、約 90%と推定された (Figure 1B)。

Table 1. Expression and purification of recombinant SmSUOX.

Fraction	Total protein (mg)	Total activity ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Yield (%)	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	Purification (x-fold)
Cytosol	1,516	540.5	100	0.36	1
Elution Ni-NTA	7.00	216.4	40.0	30.9	86.7
Flow-through Chitin	6.69	166.3	30.8	24.9	69.7

(2) rSmSUOX 標品の酵素学的性状

精製した rSmSUOX 標品を用いて、定常状態反応動力学 (steady-state kinetic analysis) に用いる最適条件を決定した。酵素濃度を変化させて rSmSUOX 標品の活性を測定したところ、0.01 $\mu\text{g/mL}$ から 1.0 $\mu\text{g/mL}$ まで線形用量応答 (linear

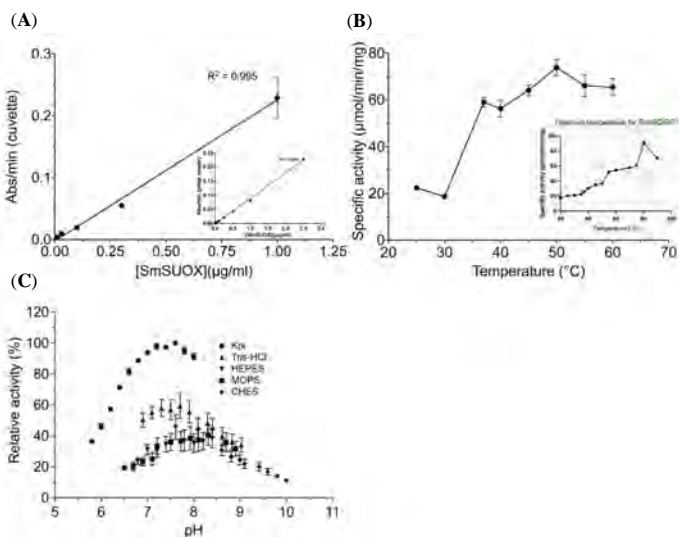


Figure 2. Optimization of SUOX activity assay. (A) SUOX activity was assayed under varying concentrations of rSmSUOX, ranging from 0.01 $\mu\text{g/mL}$ to 3 $\mu\text{g/mL}$ in a 1 mL reaction mixture containing 50 mM HEPES pH 7.6, 50 μM cytochrome *c*, at RT. The inset shows rSmSUOX activity assayed under 0.01 $\mu\text{g/mL}$ to 1.25 $\mu\text{g/mL}$ of rSmSUOX. (B) rSmSUOX activity was assayed at 550 nm under varying temperatures from 25 $^{\circ}\text{C}$ to 60 $^{\circ}\text{C}$ in triplicate. Temperature-dependent activity of rSmSUOX is shown in the inset (Talaam *et al.*, manuscript in preparation). (C) pH optimization was performed using plate reader under different pH conditions at RT. The reaction was measured at 550 nm in triplicate.

興味深いことに、pH7.0~8.0 の測定条件において、リン酸カリウム緩衝液 (KPi) を用いた時に rSmSUOX 標品の活性が顕著に高く、Tris-HCl 緩衝液を用いた測定がこれに続いた (Figure 2C)。哺乳類宿主体内での生理的な温度条件を考慮し、steady-state kinetic analysis での最適な測定条件は、温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、rSmSUOX 標品の濃度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、KPi 緩衝液 pH7.6 とした。

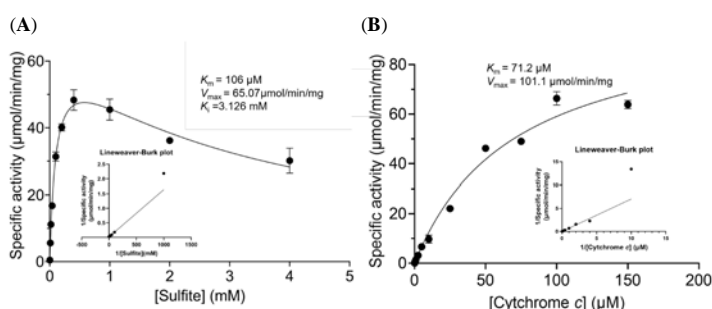


Figure 3. Determination of kinetic parameters of rSmSUOX. Kinetic parameters of sulfite (SO_3^{2-}) and cytochrome *c* were determined at 37 $^{\circ}\text{C}$ and KPi buffer pH 7.6 by the direct reduction of cytochrome *c* at 550 nm in triplicate. (A) The K_m and V_{max} of SO_3^{2-} were determined with varying concentrations of SO_3^{2-} from 0.0001 to 4 mM at fixed concentration of 50 μM cytochrome *c*. Note that at concentrations of SO_3^{2-} higher than 0.4 mM, the SUOX activity is inhibited with a calculated K_i of 3.126 mM. (B) Similarly, K_m and V_{max} of cytochrome *c* were determined with varying concentrations of cytochrome *c* from 0.1 to 150 μM at fixed concentration of 0.4 mM SO_3^{2-} . These data were calculated using GraphPad Prism 9.0 software.

dose-response) が観察され、この時の R^2 値は 0.995 であった (Figure 2A)。rSmSUOX 標品の活性の至適温度は 50 $^{\circ}\text{C}$ であったが、同標品は 37 $^{\circ}\text{C}$ から 60 $^{\circ}\text{C}$ の間で最大活性の 80.0~88.7% の活性を保持していた (Figure 2B)。pH を変化させた測定での rSmSUOX 標品の活性は、pH7.6 で最大活性を示すベル型反応 (bell-shaped response) を示した。興味深いことに、pH7.0~8.0 の測定条件において、リン酸カリウム緩衝液 (KPi) を用いた時に rSmSUOX 標品の活性が顕著に高く、

基質 SO_3^{2-} と電子受容体 cytochrome *c* のそれぞれに対する K_m と V_{max} は、一方の濃度を固定し、他方を変化させて測定した。 SO_3^{2-} と cytochrome *c* に対する K_m は、それぞれ、106 及び 71.2 μM であった。また、 V_{max} は、それぞれ、65.07 及び 101.1 $\mu\text{mol/min/mg}$ protein であった (Figure 3A 及び B)。一方、高濃度の SO_3^{2-} 存在下では、阻害定数 (K_i) が 3.126 mM となり、明確な基質阻害が観察された。 V_{max}

から算出した rSmSUOX 標品のターンオーバー数 (K_{cat}) は、 SO_3^{2-} に対するそれが $67.9 s^{-1}$ 、cytochrome *c* に対するそれが $105.5 s^{-1}$ となり、ニワトリ ($71.4 - 85.0 s^{-1}$) 及びヒト ($26.9 s^{-1}$) SUOX の K_{cat} と比較して高いことが分かった。

(3) チオ硫酸による rSmSUOX 活性の阻害作用

SmSUOX が $S_2O_3^{2-}$ を基質として利用できるかどうかを調べるため、まず SO_3^{2-} を $S_2O_3^{2-}$ に変換して、cytochrome *c* の還元活性を測定したが、この活性は観察されな

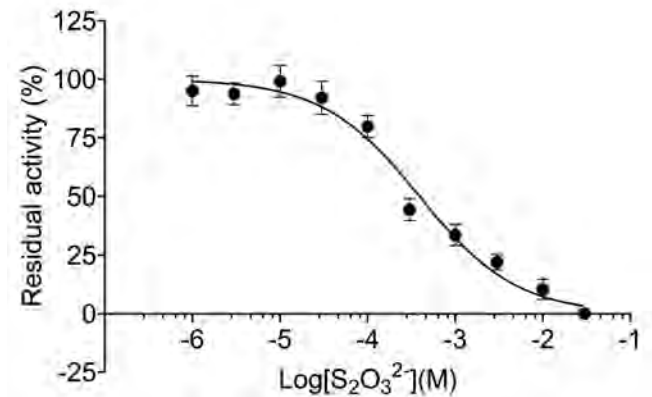


Figure 4. Inhibition of rSmSUOX activity by $S_2O_3^{2-}$. The SUOX activity was assayed in the presence of $S_2O_3^{2-}$ at 550 nm, and Residual activity (%) relative to the well without $S_2O_3^{2-}$ (100%) and with 30 mM $S_2O_3^{2-}$ (0%) were plotted. The concentrations of $S_2O_3^{2-}$ used for this assay were 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, and 30 mM. The IC_{50} of $S_2O_3^{2-}$ was determined to be 0.391 ± 0.038 mM using GraphPad Prism 9.0.

かった (データは示さず)。一方、 SO_3^{2-} と $S_2O_3^{2-}$ の両者が存在する場合、rSmSUOX 標品による cytochrome *c* の還元活性は、 SO_3^{2-} のみ存在下で測定した時の活性と比較して大幅に低下した (Table 2)。そこで、チオ硫酸 ($H_2S_2O_3$) の SUOX 活性阻害作用を調べたところ、 IC_{50} が 0.391 mM となった (Figure 4)。

Table 2. rSmSUOX activity without (None) and in the presence of 5 mM $S_2O_3^{2-}$.

Additives	Specific activity	K_{cat}	Relative activity
	($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	(s^{-1})	(%)
None	22.3 ± 0.62	23.2	100
$S_2O_3^{2-}$	0.36 ± 0.06	0.37	1.6

【考 察】

K_m 値及び V_{max} 値の測定結果から、SmSUOX の基質 sulfite 及び電子受容体 cytochrome *c* との親和性が、哺乳類の酵素と比較して低いことが分かった。低 sulfite 濃度の環境で機能する哺乳類の SUOX とは異なり、マンスン住血吸虫の SUOX では、この吸虫が生息する高濃度の sulfite 環境に適応するために、基質親和性が低くなる、即ち、高濃度の基質存在下で高い酵素活性が得られる適応が生じたと考える。このことから、高濃度硫化水素環境適応に SUOX が関係することが考察された。一方、 H_2S -キノンオキシドリダクターゼ (SmSQOR) は $S_2O_3^{2-}$ を産生し、SmSUOX の機能を調節している可能性があり、 $S_2O_3^{2-}$ は SUOX の阻害剤として働くことが初めて示された。SmSQOR と SmSUOX の両方が存在する場合、SmSQOR は H_2S と SO_3^{2-} を利用して $S_2O_3^{2-}$ を生成し、SmSUOX の活性を抑制して ATP 生成に用いられる電気化学勾配を効率的に形成することができると考える。この制御系の生物学的意義については、*S. mansoni* 各発育ステージでの SQOR 及び SUOX

の発現プロファイル解析の結果を待って、考察したい。

③ 成果の公表

(1) 6TH WORLD CONGRESS ON HYDROGEN SULFIDE IN BIOLOGY & MEDICIN 第6回
国際硫化水素医生物学会 BUDAPEST, HUNGARY にてポスター発表

6. 自己評価

rSmSUOX 標品の発現と精製については、その生化学的性状解析に支障のない分量及び精製度の標品の作製に成功した、また、その酵素学的性状の解析についても十分なデータが取得出来た。rSmSUOX 標品に対するウサギ免疫血清の作製にも着手することが出来た。一方、SmSUOX の *S. mansoni* 各発育ステージでの発現プロファイル解析については、データをまとめることが出来ず、定量 RT-PCR による遺伝子発現プロファイル解析を加えた実験計画を令和 5 年度共同研究にて、再度実施することがになった。

7. 達成度（何れかに○）

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

「6. 自己評価」にて記述済み。

第 2 部

研 究 集 会

2022 General Joint Research Seminar Report (self-evaluation)

1. Seminar Title : 医学研究のための倫理に関する国際セミナー
Project number : 2022-A-01
Scheduled period : Year 2022 Month 6 Day 1 ~ Year 2022 Month 6 Day 3
2. Principal investigator : 長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科
准教授 Nguyen Tien Huy
3. Amount allotted : 1,000,000 yen
4. Outline of research seminar
The Declaration of Helsinki, CIOMS, WHO guidelines, and ICH-GCP guidelines are currently applied as global ethical standards in medical research. These guidelines generally stipulate the ethics codes for medical research on human subjects and the ethics codes for individual researchers' personalities as a globally unified Minimum Requirement. However, more detailed consideration is required to apply this spirit to actual research sites, especially in developing countries. This seminar invited experts in medical research ethics, researchers involved in medical research and other fields from several countries, and Nagasaki University students. With the participation of experts in medical research ethics, we discussed various study cases conducted around the world, which took into account differences in culture and customs, and examined future directions. The meeting was also open to the public.
5. Implementation report :
This meeting was co-sponsored with the "International Training Course on Ethics for Medical Research". It was held online for three days from June 1 to June 3, 2022 by nine lecturers (including four from overseas and five from Japan) and 27 participants (including 23 from abroad and 4 from Japan). Cristina Torres (FERCAP-Philippines), Kwanchanok Yimtae (Khon Khen University), Utcharee Intusoma (Prince of Songkla University), Kenji Hirayama (Nagasaki University), Juntra Karbwang (SIDCER-FERCAP Foundation), Tsuyoshi Kihara (Nagasaki University), Konosuke Morimoto (Nagasaki University), Dhoubhabel Bhim Gopal (Nagasaki University), Tien Huy Nguyen (Nagasaki University) gave lectures and motivated group discussion. The lecture contents were the composition, roles, and functions of ethics committees, informed consent (consent form), evaluation of benefits and risks, guidance, and ethical issues in research conduction, especially in developing countries. Participants understood what the consensus is and what

is controversial about medical research ethics today and discussed how to deal with it.

Course description

This international course is an overview of research ethics, focusing on the ethics of health research. This course will cover the following: a) historical background, principles, and guidelines of research ethics; b) structure, roles, and functions of research ethics committees; c) ethical considerations in health research such as those related to informed consent, conflict of interest, and risk and benefit evaluation; and d) ethical issues and methodologies in different health research fields (genetics research, epidemiological and social research and pediatric research) in the context of national, regional, and international collaborative research.

Course objectives

The general objectives of this course are: a) To demonstrate a common understanding of the ethical principles in health research and b) To utilize the ethical principles in reviewing different considerations and issues related to various health research fields.

Course format

This course will (to a large extent) be organized as interactive learning where the participants will work on a number of problem cases. The case studies will illustrate the main points made in the lectures and presentations. It will be a three-day intensive course. English is a common language in the course, however, the lecturers and mentors are able to communicate in other 3 languages, i.e. Japanese, Filipino, and Thai. Comprehensive background materials will be provided to the participants.

Course organizers

Prof. Dr. Juntra Karbwang

President, SIDCER-FERCAP Foundation, Thailand

Prof. Dr. Kenji Hirayama

Professor and Head, Immunogenetics, NEKKEN, Nagasaki University

Course lecturers and moderators

Cristina Torres (FERCAP-Philippines), Kwanchanok Yimtae (Khon Khen University), Chusak Okascharoen (Mahidol University, Thailand), Phanthipa Wongwai (Khon Khen University, Thailand), Kenji Hirayama (Nagasaki University), Juntra Karbwang (SIDCER-FERCAP Foundation),
Facilitators·Tsuyoshi Kihara (Nagasaki University), Konosuke Morimoto (Nagasaki University), Dhoubhabel Bhim Gopal (Nagasaki University), Tien Huy Nguyen (Nagasaki University)

Course venue

Global Health General Research Building in Sakamoto Campus, Nagasaki University

All the lectures and workshops will be conducted via an online system.

Course fee

Free to all participants

The course is financially supported by the Institute of Tropical Medicine (NEKKEN)

Course outline

First Day: June 1, 2022 (Wednesday)

- | | |
|-------|--|
| 08:45 | Inaugural session
Facilitators: Kenji Hirayama
Introduction to the workshop
Presentation of participants |
| 09:15 | Introduction to research ethics: History and the need of an ethical review system (Juntra Karbwang) |
| 10:00 | Break |
| 10:30 | Roles and functions of research ethics committees (Phanthipa Wongwai) |
| 11:15 | Informed consent (Juntra Karbwang) |
| 12:00 | Lunch |
| 13:00 | Conflict of interest (Kwanchanok Yimtae) |
| 13:30 | Vulnerability, Risks and benefits evaluation (Cristina Torres) |
| 14:15 | Break |
| 14:30 | Case Study (3 cases): Group discussion (Kwanchanok Yimtae, Cristina Torres, Phanthipa Wongwai, Kenji Hirayama, Juntra Karbwang, Tsuyoshi Kihara, Konosuke Morimoto, Dhouhabel Bhim Gopal, Nguyen Tien Huy) |
| 15:30 | Case Study: Reporting and Plenary discussion (Juntra Karbwang & Kwanchanok Yimtae) |
| 17:00 | End of day one |

Second Day: June 2, 2022 (Thursday)

- | | |
|-------|---|
| 08:30 | Ethical issues in pharmacogenomics research (Kenji Hirayama) |
| 09:00 | Ethical issues in Emergency Medicine Research (Kwanchanok Yimtae) |
| 09:45 | Ethical issues in epidemiological and social research (Cristina Torres) |
| 10:30 | Break |
| 11:00 | Ethical issues in pediatric research (Chusak Okascharoen) |
| 12:00 | Lunch |

- 13:00 Case Study 2: Group discussion(Kwanchanok Yimtae, Cristina Torres, Phanthipa Wongwai , , Kenji Hirayama, Juntra Karbwang, Tsuyoshi Kihara, Konosuke Morimoto, Dhoubhabel Bhim Gopal, Nguyen Tien Huy)
- 15:00 Break
- 15:30 Case Study 2: Reporting and Plenary discussion (Juntra Karbwang & Kwanchanok Yimtae)
- 17:00 End of day two

Third Day: June 3, 2022 (Friday)

- 09:00 Ethical issues in international health research: Study design, informed consent, level of care, post trial benefit (Cristina Torres)
- 10:30 Break
- 11:00 Plenary discussion (Cristina Torres and Juntra Karbwang)
- 12:00 Presentation of certificate (Kenji Hirayama)
- End of the course

Course participants

The target participants for this course are postgraduate students, researchers in biomedical sciences (including health social sciences), and members of research ethics committees.

- Vicente Sotto Memorial Medical Center, Cebu
 1. Dr. Maria Philina P. Villamor: p_squared2005@yahoo.com
 2. Dr. Shanida Camomot: shanida_camomot@yahoo.com
 3. Ms. Chona Baltazar: dpo@vsmmc.doh.gov.ph
 4. Fr. Raphy Catane: fr.raphydcatane@gmail.com
 5. Ms. Catherine Ruiz: cathyruiz@gmail.com
- Research Institute for Tropical Medicine
 6. Edison R. Alberto, MD - edison.alberto@ritm.gov.ph
 7. Veronica L. Tallo, PhD - veronica.tallo2015@gmail.com
 8. Salud Zaldivar, RN, MA - saludzaldivar5@gmail.com
 9. Jeniffer Landicho - jenski_08@yahoo.com
- Lung Center
 10. Gladys L. Gillera, MD - ggillera.lcpierb@gmail.com
 11. Czarina J. Mora, MD - cjoaquinmora@gmail.com
 12. Glynnna O. Cabrera, MD - gcabrera.lcpierb@gmail.com
 13. Lizbeth G. Jacaban, MD - ljacaban.lcpierb@gmail.com
- Baguio General Hospital
 14. Dr. Concesa B. Padilla - concesa_padilla@yahoo.com
 15. Dr. Celestrel May W. Oras-Macalingay - celestrellmay@yahoo.com
 16. Dr. Eleonor D. Cuarte - edrcuarte@gmail.com

- 17. Atty. Ruth B. Bawayan - ruthbawayan@gmail.com
- University of the East
 - 18. Dr. Jennifer M. Nales - jmnailes@uerm.edu.ph
 - 19. Dr. Maria Milagros U. Magat - dr.mmumagat@gmail.com
 - 20. Dr. Vinna Marie T. Quiñones - eirammd01@yahoo.com
- Far Eastern University (4)
 - 21. Dr. Milagros Neri - mfneri@feu-nrmf.edu.ph
 - 22. Dr. Nimfa Baria - nimbar_md@yahoo.com.ph
 - 23. Dr. Lorelie Ann Rivera - lcrivera@feu-nrmf.edu.ph
 - 24. Dr. Priscila Doctolero - pdoctolero2004@yahoo.com
- National Kidney Transplant Institute
 - 25. Dr. Sigrid Agcaoile - sigrid.agcaoili@gmail.com
 - 26. Dr. Victoria Regina Pineda - victoriaregina65NY@gmail.com
 - 27. Lumberto Mendoza - mendoza.lumberto@gmail.com

6. Self-evaluation

An international training course on research ethics in English was held online for three days from June 1 to June 3, 2022., with by nine lecturers (including four from overseas and five from Japan) and 27 participants. We gathered 27 people (including 23 from abroad and 4 from Japan) and held a gathering seminar unlike any other in the world. There were many participants from various countries and active discussions were held from an international perspective, demonstrating the characteristics of this workshop. A questionnaire survey of the participants revealed that the content was well received, although there were some difficulties in using English. This year was the 21th course, led by Ms. Cristina Torres, FERCAP Coordinator of WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center in Thailand. We were also able to discuss trends. The results were better than expected.

7. Attainment level (circle one of I to IV below)

I (Few expected results were achieved.)

II (Not fully satisfied, but certain results were achieved.)

III (The expected results were attained with full satisfaction.)

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

Explanation is as in no.6 above.

令和4（2022）年度研究集会報告（自己評価）

1. 分野名：熱帯医学研究所 生態疫学分野

研究集会の名称：マラリア対策に資する研究手法・機材開発の研究集会：媒介蚊に係るフィールドサイエンスの視点から

採択番号：2021-A-02

開催期間：令和4年9月23日（金）～令和4年9月25日（日）

2. 代表者：益田岳（東京女子医科大学医学部・助教）

参加人員：星 友矩, 竹内 佑, 前野 芳正, 岩下 華子, 益田 岳, 亀岡 大真, 東城 文柄, 門司 和彦, 高橋 佳子

3. 決定額：500千円

4. 実施計画

マラリアは主要な感染症の一つである。国際関係機関が対象国とともにマラリアの根絶にむけて各種方策を行っているが、現在も解決できていない感染症となっている。マラリアはアフリカでは植生豊かな農村部だけでなく近年、都市部でも感染がみられ、東南アジアの森林マラリアとともにそれぞれユニークな自然環境や媒介蚊の種などが大きく異なる事などを反映している。なかでも東南アジアで拡大がみられている人獣共通感染性サルマラリアは新興感染症として注目をされ、マラリア根絶への障害となっている。かかる状況において、マラリア原虫の伝播の重要な位置を占める媒介蚊を中心とした多角的な新しい種々の技術をとりにいれ、解析を行う事により、ヒトから得られた結果の補完や感染、伝播の場の特定などの新知見が得られることを期待される。本研究集会は「マラリア対策に資する研究手法・機材開発の研究集会：媒介蚊に係るフィールドサイエンスの視点から」と題し、媒介蚊を主体とした独創的かつ新規性のあるフィールド研究を行う新しい研究手法や機材の開発のため、発展的な課題を議論し、お互いの技術を融合させ、研究手法から研究機材開発を推し進め、熱帯医学研究分野に寄与することを目指す。

5. 実施報告：

【目的】

研究集会の目的は「マラリア対策に資する研究手法・機材開発」を主軸として、フィールドベースの研究手法や独自機材の開発を推し進めるべく、その方向性を議論する。これまで主に技術的および経済的観点や安全性から未踏であった研究が、進歩が目覚ましい最新技術や個々の製品の展開をふまえ、近年実施可能となってきた。異なるマラリア感染が起きている対象地、人獣共通感染症サルマラリアが起きているマレーシアとヒトマラリアが起きているマラウィ・ケニアに於ける研究活動から生まれた問題意識や手法・技術を共有

し、洗練化させる。一部の研究者によって探索的に実施されてきたこれら新技術ベースのフィールドベースの熱帯医学研究を、ここで一度振り返り、今後の大規模プロジェクトへのスケラビリティ確保のため総括し方向性を確認する。上記検討対象地は種々の自然環境やそれに伴う各種の要因が大きく異なっている。そのため各研究フィールドでの新技術に裏打ちされた新手法展開のノウハウ等を検討し、さらに熱帯医学研究所に導入している3Dプリンター等の機器の共同利用に関する議論を行う。加えて、大規模プロジェクトへの対応等の観点から、これまで別々であった開発ソフトウェア等の統一について精査し、協働作業用の開発プラットフォームを策定することを議論する。そしてこの集会・共同研究から生まれた解析方法や開発機材が熱帯医学研究分野、保健医療分野に寄与することを目指す。

【研究会の内容】

研究会は2日半にわたって開催され、五島列島福江島において以下のスケジュールで実施されました。

9月23日

午前 福江島に集合、港および空港からピックアップ

12:00～14:00 ランチ

14:00～17:00 昼食後、全員で会場設営、自己紹介、質疑応答、交流会

19:00～21:00 夕食後、自己紹介、質疑応答、交流会の続き

9月24日

午前

東城 文柄氏による人獣共通感染症マラリア研究におけるGISの活用事例の発表

自由討論

12:30～14:00 ランチ

午後

益田 岳氏による機械学習やロボットを活用した発生源処理型省力化マラリア対策IVMの発表

星 友矩氏による3Dプリンターを用いた独自機材開発の発表

岩下華子氏によるマピラリーでのシティズンサイエンス@ケニア・ビクトリア湖畔の発表

前野芳正氏による人獣共通感染症マラリアのフィールド研究における分子生物学的手法の発表

自由討論

9月25日

午前

亀岡大真氏によるドローン熱画像によるインドネシア泥炭地の環境サーベイランスの発表

星 友矩氏による 3D プリンタでの設計と制作例のデモ

星 友矩氏によるテックシェア（ファイナンス、プレゼンテーション等）

会場片付け

12:00～13:00 ランチ

13:00～15:00 マピラリー（スマートフォンのみでグーグルストリートビューのようなクラウド地図を作成できる仕組み）のフィールドトライアル

16:00 空港にて解散

【参加者リスト】 *印の方はリモート参加

研究者氏名	所属・職名
益田 岳	東京女子医科大学・助教
東城 文柄*	東京外国語大学・准教授
岩下 華子	東京女子医科大学・准講師
星 友矩	長崎大学・助教
門司 和彦*	長崎大学・教授
竹内 佑	長崎大学・特任研究員
亀岡 大真	国際農林水産業研究センター・研究員
前野 芳正	長崎大学・客員教授
高橋 佳子*	長崎大学・特任研究員

6. 自己評価

研究集会の目的は、「マラリア対策に資する研究手法・機材開発」を中心に議論することで

あった。参加者はマラリア研究を中心にフィールドワークを行っている研究者や大学院生であった。

初日には十分な時間をかけて自己紹介やアイスブレイクが行われた。研究会では、各自が問題意識や手法・技術について紹介し、共有しながら議論する形式で進められた。活発な質疑応答が行われ、リラックスした雰囲気の中で進んだ。参加者は、スマートフォンを使った住民による主題地図作成や、3Dプリンタを利用した造形・設計・出力の実演、ドローン、クラウドGISリソース、ポータブルな分子生物学的解析装置、熱赤外線カメラ、AIを用いた画像解析など、具体的な例を紹介し、これらの技術や手法の活用について議論された。

参加者のバックグラウンドや研究対象地は異なっていたが、持ち寄られたエピソードはお互いを刺激し、新たな研究プロジェクトへのアイデアがいくつか生まれた。研究会終了後も参加者同士が連絡を取り合い、派生的な研究会が発生した。

例えば、ドローンとマルチスペクトルカメラを用いた研究会では、外部の工学研究者と共同でフィールド研究が進展し、その成果の一部が論文としてまとめられた（現在は限定公開中のもの1編、査読中のもの1編）。

紹介されたGIS技術は参加者によってすぐに活用され、研究の進展に貢献している。また、3Dプリンタの技術供与や共同利用も進行中である。このような波及効果は、単発の研究集会としては異例であり、主催者の期待を上回っている。新たな研究の展開として続いていることを高く評価したい。

7. 達成度（何れかに○）

I （予想した成果はほとんど挙げられなかった）

II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）

III （予想通りの成果を挙げられた。満点）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

第 3 部

海外拠点連携共同研究

令和 4（2022）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：デングウイルス認識抗体の網羅的解析系の構築

課題番号：2022-Kyoten-1

2. 代表者：（国立感染症研究所・主任研究官）宮内 浩典

共同研究者：（ベトナム拠点・教授）長谷部太、（ベトナム拠点・助教）竹村太地郎

3. 決定額：700 千円

4. 研究計画

① 研究目的

デングウイルス（DENV）はフラビウイルス科に属し、蚊によって媒介される代表的なアルボウイルスである。世界中の DENV 感染による疾病負荷は甚大であることから、DENV 感染制御手法の開発は国際的に喫緊の課題となっている。しかし、抗体依存性感染増強（ADE）によりワクチン自体が重症化リスクを増大させてしまうことも報告されており、感染制御法の開発には至っていない。デング感染症の重症度と体液性免疫応答には相関があることがこれまでの研究から示唆されているが、どのようなエピトープを認識する抗体が重症化の阻害に寄与しているのかは不明である。また抗体レパトアとウイルス増殖抑制の関連についても不明な点が多い。これらの問題を解決するためには、デングウイルス感染患者におけるウイルス認識 B 細胞のハイスループットな網羅的解析が必要と考えられるが、そのようなシステムは存在しない。そこで本研究ではデングウイルス認識ヒト抗体の網羅的な解析を可能とする、偽ウイルス粒子（VLP）プローブと NGS による BCR 解析法の樹立を目的とする。

② 研究内容

本研究ではまずデングウイルス認識 B 細胞を分離するための VLP プローブの作成をおこなった。次年度においては、作成したデングウイルス E タンパク質を取り込んだ緑色蛍光 VLP がベトナム拠点にて得られた、ウイルス感染患者の B 細胞を認識することを確認する。VLP に抗原非特異的に結合する B 細胞は、E タンパク質を取り込ませていない赤色蛍光 VLP の蛍光標識を指標として排除する。これらの VLP プローブを用いて、セルソーターによってデングウイルス感染患者 PBMC より、E タンパク認識 B 細胞を分離し、シングルセル PCR により IgG 遺伝子の H 鎖と L 鎖後、シーケンシングにより塩基配列を決定する。決定した配列をもとに IgG を再構築、発現させ、E タンパク質への結合能を確認する。さらに E タンパク質のアミノ酸配列から 16 アミノ酸程度のオーバーラップペプチドライブラリーもしくは点変異を導入した偽 DENV を用いて、再構築した IgG のエピトープ決定へと発展させる。

③ 予想される成果

E タンパク結合 B 細胞をデングウイルス感染患者 PBMC より簡便に分離し、E タンパク認識 BCR レパトアと、IgG をハイスループットで解析可能なシステムを構築する。このシステムによりデングウイルス感染患者の DENV を標的とする BCR レパトアと病院から収集する臨床経過情報を相関解析することで、デング熱との重症度の相関を明らかとすることが可能となる。これによって、BCR のレパトアを調べることで、デングウイルス感染時の重症度の予測が可能となる。また、デングウイルス感染者中の IgG 抗体とデング熱の重症度の関係を明らかとできれば、重症化を抑制する IgG のエピトープを同定し、抗体によるデング熱の抑制メカニズムを解明することが期待できる。本研究は拠点のもつデングウイルス感染患者検体より、高感度かつ網羅的にデングウイルス抗体の遺伝子情報を抽出し、デングウイルス認識抗体パネルを作成するための、基盤システムを構築することを目的としている。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

本年度においては、ウイル様粒子(VLP)を利用して、デングウイルス E タンパク結合 IgG をハイスループットで解析可能なシステムを構築する予定であった。しかしながら、E タンパク質導入ウイル様粒子(VLP)は不安定で大量合成が困難であることが明らかとなった。そのため E タンパク質をより安定な担体であるレジンビーズに結合させるシステムに方針を変更した。デングウイルスの4種の血清型のうち3種類について、レジンビーズ結合型蛍光標識プローブとして作成を完了し、血清型1の E タンパク質プローブについては、抗デングウイルス E タンパク質抗体を検出可能であることを確認した。これらの結果から、E タンパク質結合 IgG のハイスループット解析の基盤は整ったと言える。

当初は本年度中に発熱患者血清を用いた解析を行う予定であったが、ヒト倫理審査などの手続きに想定より時間がかかったため、期間中でのヒトサンプルでの解析には至らなかった。

② 成果（結果+考察）

デングウイルス E タンパク結合 IgG をハイスループットで解析可能なシステムの構築を目的として、E タンパク質のレジンビーズ結合型蛍光標識プローブ作成を試みた。デングウイルスの E タンパク質細胞外領域を Halo リガンドレジンビーズと共有結合する Halo タグタンパク質と赤色蛍光タンパクである Cherry の融合タンパク質として発現する CMV ドライブ発現プラスミドベクターを構築した (Fig. 1A)。デングウイルスには1～4の4つの血清型が存在するが、そのうち血清型1, 3, 4の E タンパク質のそれぞれについて、上記の発現ベクターを構築した (Fig. 1B)。これらの発現ベクターを 293T 細胞に遺伝子導入し、融合タンパク質の発現を抗 Cherry 抗体を使用したウェスタンブロッティング法により確認した。デングウイルス血清型1, 3, 4の E タンパク質について Halo タグと Cherry と融合した約 125kDa のタンパク発現が認められた (Fig. 1C)。また血清型1の E タンパク Halo-Cherry 融合タンパク質は、血清型1デングウイルス E タンパク質認識抗体によっても 125kDa での発現が認められた (Fig. 1C)。これらの結果から E タンパク Halo-Cherry 融合タンパク質はデザインした通りに正常に発現していることが示唆された。

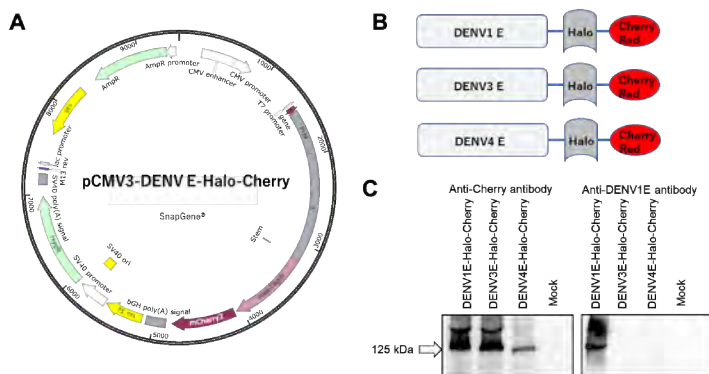


Figure 1: (A) Eタンパク融合タンパク発現ベクターマップ、(B) Eタンパク融合タンパク概略図、(C) Eタンパク融合タンパク発現のウェスタンブロッティング解析

異なる血清型のデングウイルスに対する抗体をハイスループットに解析する系を構築するためには、血清型の異なる E タンパク Halo-Cherry 融合タンパクプローブを同じ解析系で区別できることが重要である。そのため、

我々は次に、デングウイルス E タンパク Halo-Cherry 融合タンパクが結合する Halo リガンドビーズを蛍光色素で標識することを試みた。具体的には Halo タグに SNAP タグを融合したタンパク質発現ベクターを構築した。SNAP タグも Halo タグ同様に SNAP リガンドと呼ばれる合成リガンドと共有結合を形成するが、その特異性は Halo タグリガンドとは異なっており、SNAP タグは SNAP リガンドとのみ結合する。プローブの基本設計を Fig. 2 に示した。市販の Halo リガンドレジジンビーズ(HaloL-Bead)とデングウイルス E タンパク Halo-Cherry 融合タンパク質、Halo-SNAP 融合タンパク質、緑色蛍光 SNAP リガンド(SNAPLGreen)を混合すると、レジジンビーズに Cherry 蛍光を有する E タンパク質と緑色蛍光色素が補足される。SNAP リガンドとして多彩な蛍光色素が市販されているため、デングウイルス E タンパク質の血清型ごとに SNAP リガンドの色素を変更すれば、血清型ごとのプローブを蛍光色素の違いで区別することができる。このようにして作製したデングウイルス E タンパク質プローブに、抗デングウイルス抗体を含むヒト血清を加え、抗ヒト IgG 抗体を用いてその結合を検出することで、血液に含まれるそれぞれの血清型への結合抗体と、抗体産生 B 細胞を解析することが可能である。

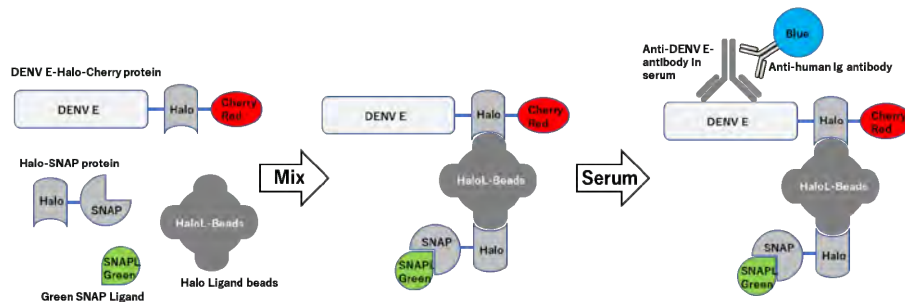


Figure 2: (A) Eタンパクプローブによる抗Eタンパク質抗体検出システム概念図

このプローブを用いて抗デングウイルス抗体が検出できることを確認するため、血清型 1 のデングウイルス E タンパクプローブを作製し、市販の 2 種類の抗デングウイルス E マウスモノクローナル抗体 (クローン DE1 および DE2) と混合した後、抗体の結合を抗マウス IgG 抗体で検出した。その結果、DE1、DE2 いずれの抗デングウイルス E 抗体についても E タンパク Halo-Cherry 融合タンパク質結合ビーズのみで、抗体の結合をしめす青色蛍光が認められ、E タンパク抗原特異的な抗体結合を検出できることが確認された(Fig. 3)。この解析系では、E タンパクの結合量 (Cherry の赤色蛍光)、血清型の種類 (SNAP リガンドの蛍光色素)、E タンパク認識抗体 (2 次抗体の蛍光) を同一ビーズ上で検出できるため、ハイスループットな血中抗デングウイルス E タンパク抗体のスクリーニング解析や、デングウイルスワクチン開発、E タンパク質認識 B 細胞の解析などに広く応用が可能である。

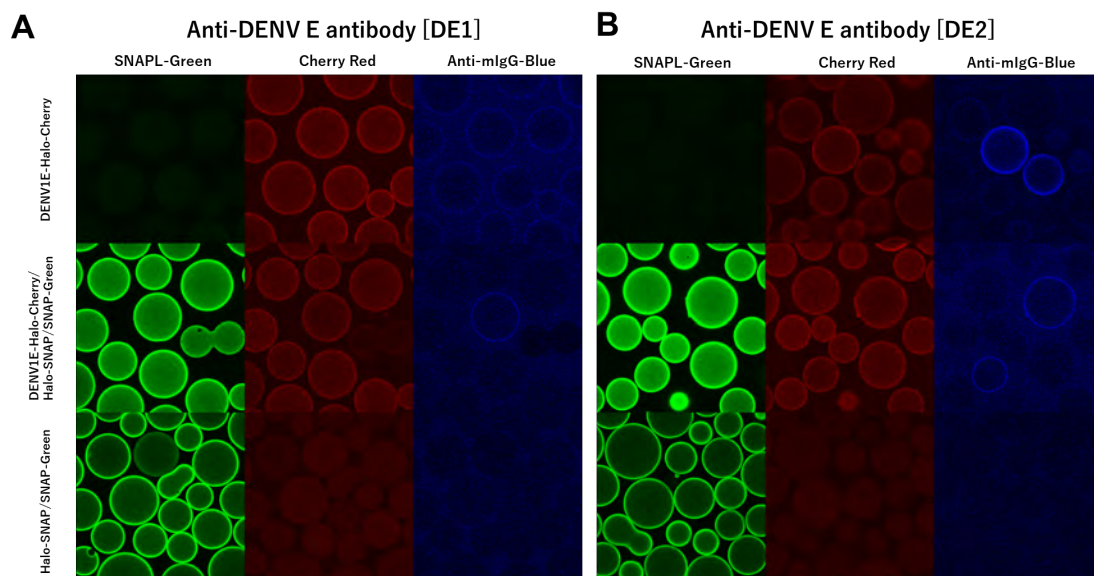


Figure 3: (A) Eタンパクプローブによる抗Eタンパク質抗体検出の実例

③ 成果の公表

現在、これらのプローブがヒト血清中の抗デングウイルス E 抗体を検出できることを確認するための検証実験を行う予定であり、その結果がそろい次第、論文として上梓する予定である。

6. 自己評価

VLP からレジンビーズへの担体の変更はあったものの、目標とした、複数の E タンパク質に対する IgG 結合を同一実験系で個別に解析可能なシステムは構築できたと考えている。しかしながら、今年度中に目標としていたヒト検体での解析までは至らなかったため、達成度は II とする。

SNAP リガンドの蛍光色素を複数混ぜ合わせることでほぼ無限の組み合わせの E タンパク質プローブを作成可能であり、フローサイトメーターとの組み合わせで、血清中の ADE 抗体や中和抗体などをきわめてハイスループットで検出できる基盤が整ったと言える。

7. 達成度（何れかに○）

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ケニアにおけるワクチン効果と分布ロタウイルス株の性状との関連の解明
課題番号：2022-Kyoten-02

2. 代表者：河本 聡志（藤田医科大学医学部・准教授）
共同研究者：福田 佐織（藤田医科大学医学部・特別研究員）
畑澤 莉緒奈（藤田医科大学医学研究科・大学院生）
明里 友樹（藤田医科大学医学研究科・大学院生）
金子 聡（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

3. 決定額：900 千円

4. 研究計画

① 研究目的

ロタウイルス（RV）は最も主要な急性胃腸炎の病原体の一つで、アフリカ・アジアの開発途上国を中心に年間12万人以上もの乳幼児が死亡している。このRV胃腸炎に対する弱毒生ワクチン（ロタリックス（RV1）、ロタテック（RV5）など）が開発されて130か国以上で認可、90か国以上で定期接種されている。その有効率は先進国で極めて高いが開発途上国（特にアフリカ・アジア）ではかなり低い。その要因として、これら開発途上国では特異な血清型（遺伝子型）を有するRV株が分布すること、ヒトと動物のRV株間での遺伝子交換（リアソートメント）が頻繁に起きていることが挙げられるものの未だよくわかっていない。一方で、すでにワクチン導入された国々では、特定のRV遺伝子型が顕著に、非定型的な遺伝子構成を有するRV株が高頻度で検出されるようになり、分布RV株の性状に大きな変化が見られるようになった。

本研究では、ケニア拠点で継続して収集しているRV下痢症患者の便検体を用いて、ワクチン接種開始前後での分布RV株の遺伝子型の変化とそのメカニズム、特にワクチン効果と分布RV株の性状との関連を明らかにする。本研究の成果は、RVに対する次世代ワクチンの開発が必要となった際の重要な実施基盤の提供を可能にすると期待される。

② 研究内容

本研究を実施するために最も重要となるのは胃腸炎患者の下痢便検体であるが、この収集にあたっては申請者が長年の研究交流により信頼関係を築いてきたケニアプロジェクト拠点／ケニア国立医学研究所（KEMRI）のDr. Ernest Apondi Wanderaの

グループで体制が整っており、ケニア国内2地区（キアンブ、ビタ）から定期的な収集が行われている。下痢便検体からのRV RNA抽出、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）解析、semi-nested RT-PCRによるG/Pタイプ決定といった初期処理については、申請者の技術移転もありケニア拠点で行われており、ワクチン導入に伴う分布RV遺伝子型の変遷についてのデータが着実に蓄積しつつある。

本研究では、収集した胃腸炎患者の下痢便検体を用いて、RVワクチン接種拡大前後での分布RV株のG/P遺伝子型、遺伝子構成の変化とそのメカニズム、特に、ワクチン効果と分布RV株の性状の変化との関連を明らかにする。

研究手法は以下の通りである。

① 下痢便検体の収集

共同研究者であるケニア拠点/KEMRIの研究者経由でキアンブ地区とビタ地区から胃腸炎患者の下痢便検体を収集する。ワクチン接種の拡大前後を含むこれまでに収集してきた下痢便検体も本研究で用いる。

② RV遺伝子の解析

イーグル最少必須培地あるいはリン酸緩衝液で調製した約20%便懸濁液からRVゲノムRNAを抽出して、PAGE解析でゲノムRNAの泳動パターンを決定する。またsemi-nested RT-PCRによるG/Pタイプ決定を行う。これら解析により、分布RV株について遺伝子型の変遷が明らかになるとともに、非定型的な遺伝子型の構成を有するRV株があれば検出される。

非定型的RV株とランダムに選別された定型的RV株について、ケニア拠点に設置された次世代シーケンサー（MiSeq）を駆使した全ゲノムシーケンシングを行う。得られた塩基配列データをもとに全11本の遺伝子分節の各々について系統樹を作成することで、各遺伝子の由来の詳細を明らかにする。中和抗原エピトープに大きな変異を有するRV株については、MA104細胞を用いたウイルス分離を行い、ワクチン既接種者血清を用いた中和アッセイを行うことで、ワクチン接種とこれら非定型的RV株の発生メカニズムとの関連を明らかにする。

こうして、胃腸炎患者の下痢便検体の収集から分布RV株のゲノム/ウイルス学的解析までをケニア拠点で完結させることを目指すと同時に、RV研究における技術と知識の移転も重視したい。

③ 予想される成果

これまでの経緯から、アフリカ・アジアで分布RV株の遺伝子型を調査することにより、先進国では殆ど検出されないことのない動物由来RV株といった非定型的なRV株が数多く検出されるものと思われる。特に、動物RV株由来の遺伝子分節を有するヒトリアソータント株が多数検出できると思われる。また、すでにワクチン導入した国々で検出されるようになった、非定型的な遺伝子構成を持つRV株も検出できると

期待される。実際に、2019年以降になってそれまでケニアでは殆ど分布していなかった G3P[8]株の検出が顕著に高まった。また、日常生活における濃厚な接触に起因すると考えられる家畜（ブタ、ウシ）の動物 RV 株に由来する遺伝子分節を持つ非定型的な G3P[6]株、G3P[8]株、G4P[6]株も検出している（Wandera et al., 論文準備中）。中国から新たに侵入したと推測される新興 G12P[6]株も検出された（Wandera et al., 論文準備中）。これら非定型的 RV 株について次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行うことで、アフリカにおける RV 伝播・進化のメカニズムをリアルタイムで明らかにできると思われる。こうして、ワクチン定期接種の開始後に分布 RV 株の性状に大きな変化が起こりつつあるケニアにおいて本研究を実施することで、ワクチン効果と分布 RV 株の性状の変化との関連についての理解が大きく進み、RV 胃腸炎に対する次世代ワクチンの開発が必要となった際の重要な実施基盤の提供を可能にすると思われる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

2023年2月に訪ケして、新型コロナウイルスパンデミック以来3年ぶりに現地での共同研究を実施した。ケニア拠点/KEMRIの研究者が継続収集していた下痢便検体について、RVゲノムG/PタイプとPAGE解析の結果をディスカッションした後に、次世代シーケンサーMiSeqで全ゲノム解析する24検体を選抜した。申請者、明里大学院生、Dr. WanderaとでRVゲノム抽出、cDNAライブラリ作製、MiSeqシーケンシングをケニア拠点で行い、一連した次世代シーケンシング実験の現地完結を目指した。

② 成果（結果+考察）

ケニア拠点での実験は、cDNAライブラリ作製までは順調に進んだものの、次世代シーケンシングではMiSeq機器不調から途中停止してしまった。そこでケニア拠点/KEMRIの承認を得た上でcDNAライブラリを凍結状態で日本に持ち帰り、藤田医科大学のMiSeq機器で再度次世代シーケンシングを行ったところ、良好な結果を得ることができた。

RVは全11本からなる分節2本鎖RNAをゲノムとして持つ。2つの外殻蛋白質VP7, VP4は独立した中和抗原であり、それぞれ血清型（遺伝子型）GタイプとPタイプを規定する。GタイプはG1~G42、PタイプはP[1]~P[58]とG/Pタイプの多様性は顕著である。さらに残る9本にも多様性が認められることから、近年では全11本の遺伝子型構成（VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5）を表記する。殆どのヒトRV株はWa遺伝子群とDS-1遺伝子群とに大別されるが、それぞれの遺伝子型構成はG1/3/4/9/12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1とG2-

P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 である。ヒト以外にも、殆どの哺乳類種と鳥類種にそれぞれ固有の RV が存在するが、種の壁は厳密ではなく、ヒトと動物（特にウシ、ブタといった家畜）間の接触が濃厚な地域では種間伝播が頻繁に起きる。

本研究の成果として、ケニアにおいても G3P[8]株 (Wa-like) の検出頻度が高いことを見出し、さらに非定型的となる A75 株 (G8P[14]) と MB25 株 (G8P[6]) を検出した。A75 株と MB25 株の遺伝子型構成はそれぞれ G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3 と G8-P[6]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 であった。A75 株の遺伝子型構成は偶蹄類 RV に特徴的である。BLAST 解析の結果から、A75 株の 11 本の遺伝子全てがヒト RV よりもウシといった偶蹄類 RV に近縁であることが強く示唆されている。MB25 株は全 11 本の遺伝子のうち 10 本 (VP7, VP4, VP6, VP1-VP3, NSP1-NSP3, NSP5) はアフリカのヒト RV に近縁であったが、残る NSP4 遺伝子についてはアフリカの偶蹄類 RV に近縁であることが示唆された。こうして、A75 株 (G8P[14]) はビリオンそのものが偶蹄類からヒトに種間伝播した偶蹄類 RV であると強く推測され、MB25 株 (G8P[6]) は、ヒト RV をバックボーンとして、偶蹄類 RV の NSP4 遺伝子を有するモノリアソータント株であると考えられた。A75 株と MB25 株とでは全 11 本の遺伝子全てが全く近縁関係を示さないことから、これら 2 株のケニアのヒト G8 株の由来と進化は大きく異なることが示唆された。現在、系統樹解析でこれら 2 株のアフリカ G8 株の詳細な由来と進化の解明を進めている。

ケニアにおいては 2014 年 7 月から RV1 ワクチンが接種導入された。ワクチン導入が分布 RV の性状に及ぼす影響を慎重に調査する必要がある。わが国のように既にワクチン導入された国々では、接種拡大とともに RV 下痢症患者数は減るものの、分布 RV の遺伝子型に大きな変化が見られるようになった。RV1 ワクチンが導入された国々では DS-1 遺伝子群の遺伝子型構成を有する RV の比率が大きく上昇するほか、世界的には G3P[8]株の検出頻度が上昇している。今回検出した A75 株 (G8P[14]) と MB25 株 (G8P[6]) のいずれもバックボーンとして DS-1 遺伝子群の遺伝子構成を持ち、RV1 ワクチンの遺伝子構成 (G1-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) とは全 11 遺伝子が全く共通しておらず、RV1 ワクチン導入と関連している可能性がある。アフリカでは、人獣共通感染症の一面を持つ RV がヒトの間、および動物との間で感染伝播を繰り返しており、結果として新型のヒト RV 流行株が発生する可能性は高くなる。ケニア拠点で分布 RV 株の遺伝子型の変遷について、注意深く監視を継続する必要がある。

③ 成果の公表

該当なし (今回検出した A75 株と MB25 株について原著論文を執筆して海外雑誌に投稿する予定である)

6. 自己評価

ケニア拠点において、私たちが10年来の研究交流を通じて技術移転してきたELISA、PAGE、RT-PCRによる下痢症患者下痢便のRV検出スクリーニング、Wa/DS-1遺伝子群の判別、G/PタイピングがDr. Wanderaのグループによって順調に稼働している点は十分に評価できる。今年度は3年越しの念願であった訪ケしての共同研究が実現し、ケニア人スタッフにMiSeqシーケンシングの技術移転することを最重点課題として現地で実験を共に行った。現地のMiSeqシーケンサー不調があったものの、Dr. Wanderaらと構築したcDNAライブラリには問題はなく、最終的には上述のように興味深いケニアのヒトG8株について貴重な情報を得ることができた。ケニア人スタッフと緊密に連携して得られた今年度の成果を基礎として、次年度にさらに発展させる道筋をつけることができた点には満足している。

7. 達成度（何れかに○）

I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和4（2022）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ケニアにおけるマダニ媒介感染症の疫学調査

課題番号：2022-Kyoten-03

2. 代表者：（山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学）早坂 大輔

共同研究者：（山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学）下田 宙

（山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学）胡 蔚殷

（山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学）Shelly Wulandari

（山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学）Nyampong Samuel

（山口大学共同獣医学研究科 獣医疫学）高野 愛

（ケニア拠点）井上 真吾

（ケニア拠点）Elizabeth Ajema Chevichi

（ウイルス学分野）Mya Myat Ngwe Tun

3. 決定額：1,500 千円

4. 研究計画

① 研究目的

マダニは、吸血によりヒトや動物に様々な人獣共通感染症の原因となる種々の病原体を媒介する。

アフリカ大陸に分布するマダニ媒介感染症の病原体としては、アフリカダニ熱の原因となるリケッチア・アフリカーゼやクリミア・コンゴ出血熱ウイルスなど、また、家畜や野生動物ではピロプラズマ、アフリカ豚熱ウイルスなどが知られている。

しかしながら、ヒトのマダニ媒介感染症については情報に乏しく、現地の共同研究者の私信によれば、マダニ刺咬により発熱や発疹などの症状を示す例はあっても診断がつかない場合も多いとのことで、実態については不明な点が多い。また、現地のマダニから新規ウイルスも多く見出されてはいるが、ヒトや動物への感染性、病原性については明らかになっていないものも多い。

マダニ媒介感染症の予防において、第一に、病原体を保有するマダニに刺されないことが基本対策となる。そのため、媒介マダニにおける病原体の浸淫状況を把握することが、感染予防上の重要な情報源となる。また、既知の病原体に加え、未知・新規の病原体も対象に、診断系や病原体検出法を確立しておくこと、血清疫学調査から感染状況を把握しておくことは、先回り研究としての意義が高い。

そこで本研究では、ケニアにおけるマダニ媒介感染症の疫学調査を実施し、媒介マダニと病原体の保有・分布状況、ヒト・動物を対象とした感染状況の血清疫学情報を得ることで、マダニ媒介感染症の予防対策に寄与する研究成果の創出を目指す。

② 研究内容

今後の本研究計画は3年間を予定しており、2022年度本応募課題では、応募者および参画者がNUITMを訪問し、井上教授の協力のもと、これまでに採集した4千匹以上のマダニについて、解析用にマダニ乳剤を作製し、病原体遺伝子検出および病原体（特にウイルス）分離を試みる。また、採集したマダニ種の分布、マダニの病原体保有、病原体の分布状況について情報を整理する。

1. マダニからの病原体遺伝子検出

NUITMおよびKEMRIに保管しているマダニについて、ビーズ破砕器を用いてマダニ乳剤を作製する。実験はBSL-3実験室内で行い、マダニ破砕はチューブ破損などの可能性を想定し、安全キャビネット内で行う。マダニサンプルはプールごと（約200プール）に調整する。マダニ乳剤は細胞培養用培地に懸濁し、遠心後、上清および沈殿物の一部を核酸抽出に供し、残りのサンプルは病原体分離に用いる。

核酸抽出キットを用いてRNA、DNA抽出を行い、NUITMの機器を利用し、ダニ媒介性フラビウイルス、オルソナイロウイルス、レオウイルス、オルソミキソウイルス、およびボレリア属、リケッチア属の特異的プライマーを用いたPCRまたはRT-PCRにより遺伝子検出を試みる。抽出した核酸は、次年度以降実施予定の次世代シーケンシングによる網羅的検出に供するため、冷凍保管しておく。遺伝子が検出された場合、塩基配列を決定し、分子系統解析を行う。

2. マダニからの病原体分離

NUITMのBSL-3実験室にて、マダニ乳剤を培養細胞（Vero細胞、BHK細胞など）に接種してウイルス分離を試みる。培養細胞は、井上教授の協力で準備するものを利用する。CPEが確認された場合、遺伝子検出の結果と併せて、RT-PCRによりダニ媒介性フラビウイルス、オルソナイロウイルス、レオウイルス、オルソミキソウイルスの遺伝子検出による確認を行う、塩基配列を決定し系統解析を行う。

ウイルスが同定できなかった場合、次年度以降、次世代シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子検出・解析を実施するために、抽出核酸を冷凍保管しておく。

③ 予想される成果

本研究は、ケニアにおいて診断法などが十分に確立しておらず、流行状況の情報も不足しているマダニ媒介感染症とその病原体に着目する点が特色である。

1. ケニアに分布するマダニ種、分布状況、病原体の保有状況の情報が得られる。応募者らは、これまで主にナイバシャ、イシオロ、バリング近郊においてマダニを採集しており、現場での主なマダニ種やマダニが生息する場所、動物に寄生するマダニ種などの情報を得ている。本研究において、マダニ中の病原体保有状況を把握することで、地域におけるマダニと病原体の分布状況を知る手掛かりとなる。
2. 本研究に先立ち、応募者らは日本国内のマダニから複数の新規ウイルス（トフラウイルス、ヤマグチウイルス等）を見出しており、新規病原体（特にウイルス）の分離とその後の解析の実績がある。また、分担者の高野准教授は、細菌、マダニを専門とするため、細菌の分離にも精通している。研究協力者となるKEMRIのDr. Rosemary Sang、Dr. Joel Lutomiahは過去にマダニから新規のオルソナイロウイルス

を見出すなど、既知・未知も含めて複数の病原体が分布していることが予想される。病原体が分離されれば。その後の性状解析、診断・予防・治療の確立につながるための貴重な材料となることが期待される。

3. 本研究では、熱帯医学を背景に、主にヒトを対象として人獣共通感染症に焦点を当てて、獣医学の立場から動物の感染症も見越して実施する。マダニは家畜の重要な病原体（原虫、ウイルス、細菌）を媒介し、現地では時に深刻な被害を及ぼしている。家畜の被害は、食料問題からヒトの健康に直接影響を及ぼすものであため、家畜の病気も熱帯医学においても重要な研究対象と考えられる。
4. 本研究では、マダニを対象とした病原体保有調査に加え、血清疫学調査の実施により、ヒト、哺乳動物における感染状況に関する有用な情報の取得が予想される。また、現地の病原体を基にした血清診断法を確立し、ケニア側への技術提供を行うため、現地におけるマダニ媒介感染症の診断体制確立に寄与する点で有意義である。
5. 採集した *Hyalomma* 属はクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) の媒介マダニであるため、CCHFV が検出される可能性も想定される。ウイルス遺伝子が検出された場合、ウイルス分離とその後の取扱いには BSL-4 施設が必要となるが、将来的に長崎大学で稼働計画が進んでいる BSL-4 施設を利用した陽性サンプルの取扱い・解析を、当施設所属研究員との共同で進められることを希望している

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

1. マダニ媒介ウイルス遺伝子検出系の確立

1) オルソナイロウイルス

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスを含むオルソナイロウイルス属のウイルス遺伝子に相同性の高い領域をターゲットとしたプライマーを設計した（Kurosaki et al., unpublished data、プライマー情報については論文未発表のため非公開）。

RT-PCR は、トフラウイルス（TFLV、Shimada et al., Sci rep. 2016）の RNA を陽性コントロールとして、PrimeScript® One Step RT-PCR Kit Ver. 2（Takara Bio）を用いて、797 b.p. の特異的バンドの検出を試みた。

2) バンダウイルス、ウークウイルス（フェニユイウイルス科）

参考文献を基に（論文発表時点の分類ではブニヤウイルス科フレボウイルス属）、バンダウイルス、ウークウイルスのウイルス遺伝子に相同性の高い領域をターゲットとしたプライマー（TBPVL2759F / TBPVL3497R）を準備した（Matsuno et al., J Virol, 2015）。重症熱性血小板減少症候群（SFTS）ウイルス（SFTSV）の RNA を陽性コントロールとし、RT-PCR は OneStep RT-PCR kit（QIAGEN）を用いて 500 b.p. の特異的バンドの検出を試みた。

3) フラビウイルス

参考文献を基に、ダニ媒介性脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス等を含むフラビウイルス属のウイルス遺伝子に相同性の高い領域をターゲットとしたプライマーを準備した（Maher-Sturgess et al., Virol J, 2008）。日本脳炎ウイルス（JEV）の RNA を陽性コントロールとし、RT-PCR は OneStep RT-PCR kit（QIAGEN）を用いて 800 b.p. の特異的バンドの検出を試みた。

2. 国内のマダニを用いたウイルス遺伝子検出の検討

マダニ乳剤作製とウイルス遺伝子検出実験をケニアにおいて実施するにあたり、渡航前に、山口大学にて各実験手順の確認を兼ねて、国内のマダニを対象にウイルス検出を試みた。

北海道（札幌近郊、江別市）で採集したヤマトマダニ（*Ixodes ovatus*）の成虫雌を 5 匹ずつ 1 プールとし、10%FCS 含む PBS 溶液中でビーズクラッシャーにより破碎した。遠心後、上清を乳剤として回収し、沈査（マダニ破碎物）から Isogen（ニッポンジーン）を用いて抽出した RNA をウイルス遺伝子検出に供した。また、乳剤は I 型インターフェロンレセプターノックアウトマウス（A129, AG129）を用いてウイルス分離を試みた（マウスは発症したが病原体かどうかは確認中）。

3. ケニアで採集したマダニからのウイルス遺伝子検出

NUITM で実験を行うにあたり、2016 年～2019 年にケニア各地で採集し、KEMRI アルボウイルス研究部門のディープフリーザーに冷凍保管していたマダニを、井上教授の協力で NUITM のディープフリーザーに移動した。

2023 年 2 月 20 日から、研究代表者（早坂大輔）および共同研究者（胡蔚殷および Shelly Wulandari）が NUITM を訪問し、マダニサンプルの確認、実験準備等を行った。共同研究者 2 名は、3 月 10 日までの約 3 週間ナイロビに滞在し、NUITM

にてマダニ乳剤の作製およびウイルス遺伝子検出の実験を行った。

4. マダニからの病原体分離

作製したマダニ乳剤からのウイルス分離については、NUITMにて培養細胞を用いて実施する計画であるが、細胞の準備や試薬の調整等により、共同研究者の滞在期間中の実施が難しかったため、引き続き井上教授および KEMRI-NUITM 所属の Elizabeth Ajema Chevichi 博士により進めている。

また、2023 年度中にマダニおよびマダニ乳剤を山口大学へ移送して、A129、AG129 マウスを用いて病原体分離を行う予定であるため、その準備を始めた。なお、KEMRI 職員の Lydia Mali が、2023 年 4 月に山口大学共同獣医学研究科博士課程に入学したため、2023 年度中にマダニを日本へ輸送し、山口大学で受け入れる見込みができています。

5. 2023 年度に実施する研究準備

本研究は 3 年間の計画であり、2023 年度はナイロビ大学獣医学部と協力し、家畜、野生、伴侶動物等の血清等のサンプルを入手し、さらに、動物由来のマダニを採集し、血清疫学調査やマダニ採集地域をひろげる予定である。そこで、研究代表者および共同研究者がナイロビに滞在中、ナイロビ大学獣医学部の Dr. Gabriel Oluga Aboge、Dr. George Karuoya Gitau と共同研究の打合せを行った。

② 成果（結果+考察）

結果

1. マダニ媒介ウイルス遺伝子検出系の確立
2. 国内のマダニを用いたウイルス遺伝子検出の検討
- 1) オルソナイロウイルス遺伝子の検出

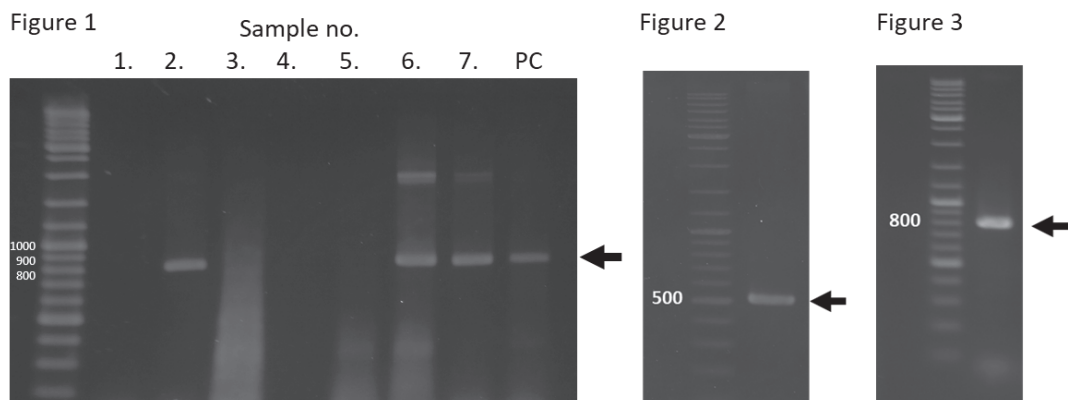
RT-PCRにより陽性コントロール（TFLV）の遺伝子が検出された（Figure 1, PC レーン）。北海道の *I. ovatus* 7 プールを用いて遺伝子検出を試みたところ、3 プール（no. 2, 6, 7）においてバンドが確認された。これらのサンプルについては塩基配列を調べる予定である。

- 2) フェニユイウイルス科遺伝子の検出

RT-PCRにより陽性コントロール（SFTSV）の遺伝子が検出された（Figure 2）。北海道の *I. ovatus* 7 プールで遺伝子検出を試みたが陽性例はなかった。

- 3) フラビウイルス遺伝子の検出

RT-PCRにより陽性コントロール（JEV）の遺伝子が検出された（Figure 3）。北海道の *I. ovatus* 7 プールで遺伝子検出を試みたが陽性例はなかった。

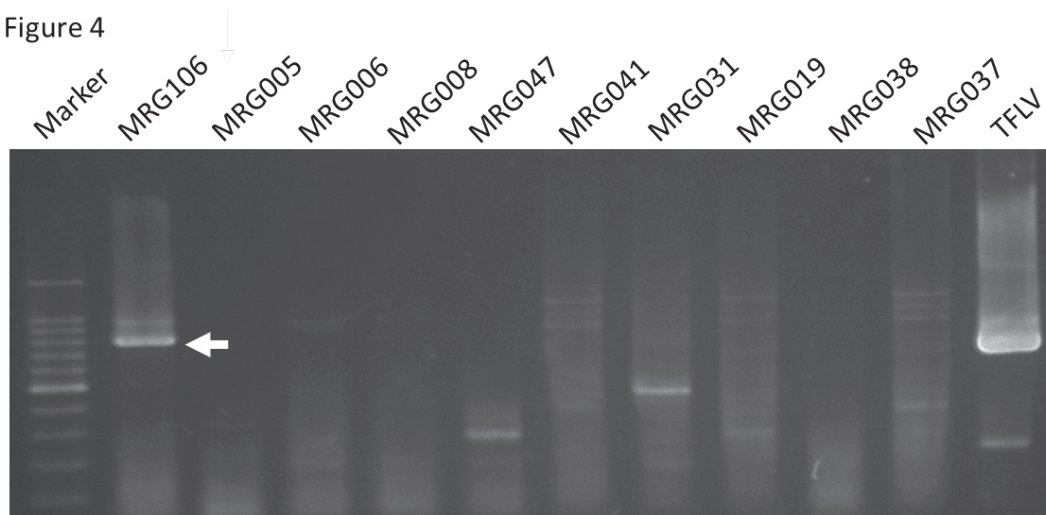


3. ケニアで採集したマダニからのウイルス遺伝子検出

2019年1月に Marigat で採集した *Rhipicephalus appendiculatus*, *R. pulchellus*, *Amblyomma gemma*, *Hyalomma truncatum* の成虫を対象に合計 68 匹 (1 匹ずつ 1 プール) について、マダニ乳剤作製、RNA 抽出、各ウイルス遺伝子検出を行った。

その結果、23 匹においてオルソナイロウイルス遺伝子検出が陽性であった (Figure 4 にバンドの例を示す)。これら 23 匹はすべて *R. appendiculatus* (雌 11 匹、雄 12 匹) で、他のマダニ種で陽性例はなかった。

Figure 4



フェニエウイルス科ウイルス遺伝子検出では、調べた 68 匹のいずれについても陽性例は確認できなかった。また、フラビウイルス遺伝子検出においても陽性例は確認できなかった。

考察

ケニアで採集した *R. appendiculatus* からオルソナイロウイルス遺伝子が検出された可能性が示された。ケニアには CCHFV や Nairobi sheep disease、Dugbe virus などのオルソナイロウイルスが分布しているため、これら既知または新規のウイルスかどうかの可能性を含めて、このバンドについて NUITM にて塩基配列を確認する予定である。また、陽性サンプルのマダニ乳剤については、NUITM にて培養細胞を用いてウイルス分離を試みる。さらに、山口大学へサンプルを移送できた場合、A129, AG129 マウスを用いてウイルス分離を試みる。ウイルス遺伝子であった場合、次世代シーケンスによる遺伝子全長配列を決定する。

また、予備試験的に国内のマダニで検出を試みたものであるが、北海道のマダニからオルソナイロウイルス遺伝子が検出された可能性があるため、北海道で報告があるエズウイルスを含め、塩基配列の決定、ウイルス分離を進める予定である。

③ 成果の公表

結果については、引続き解析を進め、結果がまとまり次第 (2023 年中をひとつの目途に)、学会での発表および論文作成を進める予定である。

6. 自己評価

2022年中の早い時期にケニアを訪問し、可能であれば複数回にわたって NUITM にて解析を進める予定であったが、年度はじめにおいては COVID-19 による影響がまだ残っていたことや、NUITM の実験室の大規模な改修、受入れ教員および渡航する研究者の都合等により、2023年2月での1回の現地での実施となってしまったため、年度中に陽性検体のウイルス分離や塩基配列解析をすることができなかった。

しかしながら、ケニアで採集したマダニからオルソナイロウイルス遺伝子陽性の可能性が示されたため、今後の解析において有望な結果と考える。2023年度も引き続き解析を進めるにあたり、ナイロビ大学獣医学部との共同研究体制も構築できたことから、今後の発展が期待できた。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和 4（2022）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ベトナムにおける下痢原性大腸菌のワンヘルスアプローチ
課題番号：2022-Kyoten-04
2. 代表者：井口 純（宮崎大学農学部畜産草地科学科・准教授）
共同研究者：長谷部 太（長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点・教授）
： Nguyen Thi Thu Huong（Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
・講師）
3. 決定額：600 千円

4. 研究計画

① 研究目的

下痢原性大腸菌（DEC：diarrheagenic *Escherichia coli*）は、発展途上国における乳幼児下痢症の主要な原因微生物であり、5歳以下の主な死亡原因にもなっている。さらに流行地域を訪れた旅行者による下痢症の原因にもなる。しかし、ベトナムを含む流行諸国において、原因となっている DEC の特徴（タイプ）や傾向に関する情報は少ない。さらに、感染原因は病原体に汚染した生活水や食品であると考えられるが、汚染源や汚染経路に関する調査はほとんど行われていない。DEC のワンヘルスアプローチにおいて、患者から分離される原因菌だけではなく、その保菌宿主を含めた汚染源や汚染経路を理解することが必要となる。そこで本研究では、ベトナムで流行する DEC の特徴を包括的に理解することを目的とし、臨床、食品、家畜などの横断的なサンプルを対象とした DEC の調査と研究を行う。

② 研究内容

試料の収集：ハノイまたはその周辺地域の複数農場において、牛または豚の糞便（計 10-20 検体）を採取する。さらに、市販されている食品（牛肉、豚肉、野菜など、計 10-20 品）を市場などで購入する。以上の 20-40 検体を試料として用いる。

分離・同定：上記試料を、大腸菌選択分離用寒天培地（DHL、クロモアガーSTEC など）に塗抹して培養し、大腸菌様コロニーを各試料から最大 20 コロニー釣菌する。大腸菌の同定と病原遺伝子（*stx1*, *stx2*, *eae*, *lt*, *st*, *ipaH*, *aggR*）のスクリーニングを既報の PCR 法で行う。試料の収集および分離・同定は、Nguyen（共同研究者）および長谷部（ベトナム拠点）が連携して実施する。必要に応じて、ベトナム国立衛生疫学研究所細菌部（特に環境・畜産における薬剤耐性細菌解析グループ）のサポートを受ける。

DNA-base の血清型別：上記スクリーニングで分離した DEC の DNA を精製し、宮崎大学へ輸送する。宮崎大学では、PCR 法により血清型の詳細を判定する。

ゲノム解析：代表株を選抜し（10-20 株）、ゲノム配列を決定する。患者由来株を含

めた横断的なゲノム比較解析の結果から、ベトナム国内で汚染・流行している DEC の基本的な特徴を明らかにする。

③ 予想される成果

上述した通り、発展途上国における下痢症の原因となる病原体の汚染源や汚染経路に関する情報は少ない。本研究によって得られるであろう成果は、ベトナムにおける畜・食・医チェーンに潜む DEC の一端を明らかにするものと期待され、感染症対策や公衆衛生の向上を図る上での政策の策定に貢献できる。また、ベトナムで分離された DEC の血清型などの情報を、他の発展途上国における下痢症患者や、発展途上国を訪れた旅行者による下痢症事例から分離された DEC と比較することで、細分類された DEC と疫学的または地理的な特徴がリンクする包括的な理解へと発展させることが可能となる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

代表者（井口）と共同研究者（Nguyen）は、ベトナム拠点スタッフのサポートにより、2022年の9月から10月にかけて現地で調査を行った（井口は9月5日から13日にかけて現地調査に参加）。当初の計画では、家畜の糞便と市販されている食品を調査対象とする予定であったが、調査前に農場との調整が付かなかつたため、ハノイおよびその周辺省のマーケットで購入した食肉（牛肉および豚肉）に調査対象を絞って実施した。分離・同定では、検査効率を上げるために、検体をmEC培地に接種し、その培養液を用いて病原性遺伝子のスクリーニングを行い、陽性であった検体のみを用いて、陽性株の分離を試みた。後述するように、6株のDECを分離することが出来たが、輸送費等の関係で分離株またはそのDNAを日本へ輸送することが出来ず、計画していたDNA-baseの血清型別およびゲノム解析は実施しなかった。分離株はハノイ拠点において-80℃で保管しており、今後、輸送方法等を検討して日本へ輸送し、詳細な解析を実施する予定である。

② 成果（結果＋考察）

ベトナム北部に位置するハノイとその周辺省（Thai Nguyen、Hung Yen、Bac Ninh、Bac Giang および Vinh Phuc）のマーケットで購入した牛肉および豚肉の計48検体（それぞれ13検体と35検体）を用いて調査した（図1, 2）。

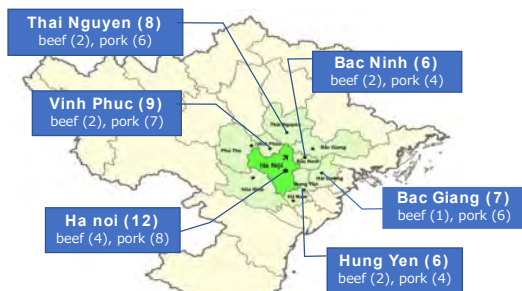


図1. 食品の購入場所と検体数



図2. マーケットの様子

DECに関連する7種類の病原性関連遺伝子をPCR法で検査したところ、それぞれ2.1%から31.3%の検体で検出された（表1）。旅行者下痢症の主な原因となる腸管毒素原性大腸菌（ETEC）の病原遺伝子（*st*と*lt*）は47.9%（23検体）から検出され、腸管出血性大腸菌（EHEC）の病原遺伝子（*stx1*と*stx2*）は14.6%（7検体）から検出された。また、病原性大腸菌（EPEC、*eae*）、腸管侵入性大腸菌（EIEC、*ipaH*）および腸管付着凝集性大腸菌（EAEC、*aggR*）に関連する病原遺伝子は、それぞれ18.8%、10.4%および3.1%から検出された。以上の結果より、市販されている牛肉および豚肉の表面には高い割合でDECが汚染している実態が明らかとなった。これら食肉は一般的に加熱調理されるが、調理場などにおいて汚染菌が調理器具や他の未加熱用食材に交差汚染する可能性があり、ヒトへの感染経路として、これらの二次汚染食品等を介した経路が示唆された。

表1. 牛肉および豚肉において検出された病原性関連遺伝子

	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ipaH</i>	<i>st</i>	<i>lt</i>	<i>aggR</i>
Beef (n=13)	7.7% (1)	15.4% (2)	0% (0)	7.7% (1)	61.5% (8)	7.7% (1)	7.7% (1)
Pork (n=35)	5.7% (2)	11.4% (4)	25.7% (9)	11.4% (4)	20.0% (7)	28.6% (10)	0% (0)
All (n=48)	6.3% (3)	12.5% (6)	18.8% (9)	10.4% (5)	31.3% (15)	22.9% (11)	2.1% (1)

陽性と判定された培養液を用いて、2種類の選択分離培地により標的とするDECの分離を試みたが、わずかに5検体から6株のDECしか分離できなかった(表2)。本研究で使用したクロモアガーSTEC(関東化学)は、O157やO26などに属する主要なEHECを効率的に分離することができる選択培地であるが、今回の調査ではこの培地に生育したコロニーからEHECを分離することが出来なかった。以上の結果より、ベトナムで市販されている食肉に汚染しているEHECは、日本や欧米などで流行しているO157などのEHECとは異なるタイプであると示唆された。培養液から病原性遺伝子は検出されるものの、その遺伝子を保有するDECが分離できない原因について、食品には大腸菌を含む雑多な細菌が汚染しており、培養液中で生育したDECの存在比も低いことから、1検体につき最大20コロニーの検査を行ったものの、多くの検体でDECの分離には至らなかったと推察された。

表2. 分離されたDEC

菌株名	病型	保有遺伝子	購入地	食品のタイプ
TN4_7	ETEC	<i>lt</i>	Thai Nguyen	Pork
HN3	STEC/ETEC	<i>stx2, stp</i>	Ha Noi	Beef
HY1-4	ETEC	<i>lt</i>	Hung Yen	Pork
HY1-8	ETEC	<i>stp</i>	Hung Yen	Pork
HY3-6	ETEC	<i>lt</i>	Hung Yen	Pork
BG2-7	ETEC	<i>lt</i>	Bac Giang	Pork

以上の成果は、ベトナムにおける食品や家畜のDEC汚染調査を行う上で有用な基盤情報となった。今後、DECをより効率的に分離するための改善が必要であると考えられた。

③ 成果の公表

2020年度および2021年度に実施した本研究の成果を取りまとめて、以下の論文を発表した。

Iguchi A, Takemura T, Ogura Y, Nguyen TTH, Kikuchi T, Okuno M, Tokizawa A, Iwashita H, Pham HQA, Doan TH, Tran NL, Tran TL, Nguyen TH, Tran TH, Pham TNL, Dao TD, Vu TMH, Nguyen TN, Vu H, Nguyen VT, Vu TTH, Le TH, Lai TA, Ngo TC, Hasebe E, Nguyen DT, Yamashiro T. Genomic characterization of endemic diarrheagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* from infants with diarrhea in Vietnam. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(4):e0011259, April 4, 2023.

6. 自己評価

2020年度と2021年度は、COVID-19の流行により日本からの渡航およびベトナム国内での移動が制限されたため、申請時に計画した現地での調査を実施することが出来なかった。そこで、ベトナム拠点に保管されていた（別の研究プロジェクトで分離された）下痢症小児由来DECのゲノム解析を中心とする研究を先行して行い、その成果を取りまとめてPLOS Neglected Tropical Diseasesに発表することができた（公表は2023年4月）。加えて、本報告書に記載した通り、2022年度は現地において食肉を用いたDECの汚染調査を実施した。分離できたDECは6株のみであったが、食肉における高い割合での汚染実態が明らかとなった。日本への菌株またはDNA輸送を調整することが出来ず、詳細解析に至らなかったことが反省される。しかし、今後の研究に繋がる一定の成果を挙げることが出来たと考える。

今後は、分離法の改善や菌株またはDNA輸送の問題を解決し、臨床、食品、家畜などの横断的なサンプルを対象としたDECの調査と研究を進展させていきたい。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の成果はほとんど挙げられなかった）
- II （不満は残るが一応の成果を挙げられた）
- III （予想通りの成果を挙げられた）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（「6. 自己評価」で述べてあれば省略可）

令和 4（2022）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ケニアにおける真菌症原因菌およびカビ毒産生菌の収集と形態学的、生理学的、分子生物学的解析
課題番号：2022-Kyoten-5
2. 代表者：（千葉大学真菌医学研究センター・准教授）矢口 貴志
共同研究者：（千葉大学真菌医学研究センター・准教授）高橋 弘喜
（千葉大学真菌医学研究センター・助教）伴 さやか
（千葉大学真菌医学研究センター・特任研究員）吉岡育哲
（Chief Research Officer Kenya Medical Research Institute） Bii C. Christine

3. 決定額：1,500 千円

4. 研究計画

① 研究目的

ケニアにおいて臨床検体より採取される真菌およびカビ毒産生などにより食糧を汚染してヒトに健康被害を及ぼす真菌を単離・培養・保存する。これらの菌種を形態的、遺伝子的に正確に同定し、日本産菌株との比較により地域特異性を明らかにし、疫学的研究を進める。単離された菌は、ケニアでの許可の取得できた範囲で日本に輸入し、千葉大において真菌症およびその原因菌種研究のためのリソースとし保存・管理し、この分野の研究推進に寄与する。

② 研究内容

初年度：

臨床検体（喀痰）から分離された *Aspergillus sect. Fumgati* および *sect. Nigri* に属する菌株を *b-tubulin*、*calmodulin* 遺伝子の塩基配列により正確な同定を行うとともに、アゾール薬に対する感受性を試験し、耐性株においては耐性機序の解析を実施する。*sect. Nigri* においては、最新の情報に基づいた系統法（STACEY 法）で種の区分と分岐群の推定を行う。

また、KEMRI 所属の研究者と共同で、ケニア各地で収集した穀物から、*Aspergillus*、*Penicillium*、*Fusarium* を分離し、菌種の正確な同定を行うとともに、カビ毒の検出を実施する。

次年度以降：

臨床および環境由来の病原性 *Aspergillus* を継続して分離し、正確な同定、薬剤感受性試験を実施する。また、カビ毒による食糧汚染は季節・気候を反映し年度によって汚染度が異なるため、継続してケニア各地の穀物から汚染菌を分離し、その分子系統的な位置づけの解析、マイコトキシン産生量を測定し、ケニア国内における

マイコトキシン産生菌の汚染実態を継時的に調査する。

③ 予想される成果

ケニアにおけるカビ毒による主要食糧の汚染の測定結果は、これまでも学会・論文発表以外に新聞、講演会などで取り上げられ、現地の人々にカビ毒汚染に対する意識を高め、QOLの向上に貢献してきた。今後も、これまでの研究成果や2国間で築き上げた信頼関係を基に、穀物汚染カビの収集、カビ毒量の測定、ヒト真菌感染症原因菌の分離、薬剤感受性試験を継続的に行い、ケニアばかりでなく日本においても、食物のカビ毒汚染、ヒト真菌感染症の疫学研究を通じて、健康リスクを把握し、その対策に貢献できる。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

1. *Aspergillus niger* 関連種の多系統合体モデルでの解析

これまでケニア国で穀物汚染の原因となり、またヒトに有害なカビ毒を産生する *Aspergillus niger* 関連種 (*Aspergillus series Nigri*) を分子系統的、形態学的に解析を行ってきた。これまで分類に使用されている calmodulin、b-tubulin 遺伝子では既知種とは区別される分岐に含まれる種があることが判明した。そこで、全ゲノムを利用した多遺伝子による系統樹は、calmodulin 遺伝子単独による系統樹では不明瞭であった分岐が明確になり、種の識別が可能となった。series *Nigri* に含まれる 276 株において benA、CaM、RPB2 遺伝子の塩基配列を用いて、4 つの single-locus method (GMYC、bGMYC、PTP、bPTP) と 1 つの multilocus method (STACEY：複数の遺伝子の DNA 配列を用いて、種の区分と分岐群の推定) を含む多系統合体モデルで、14 種を 6 種に統合することを提唱した。

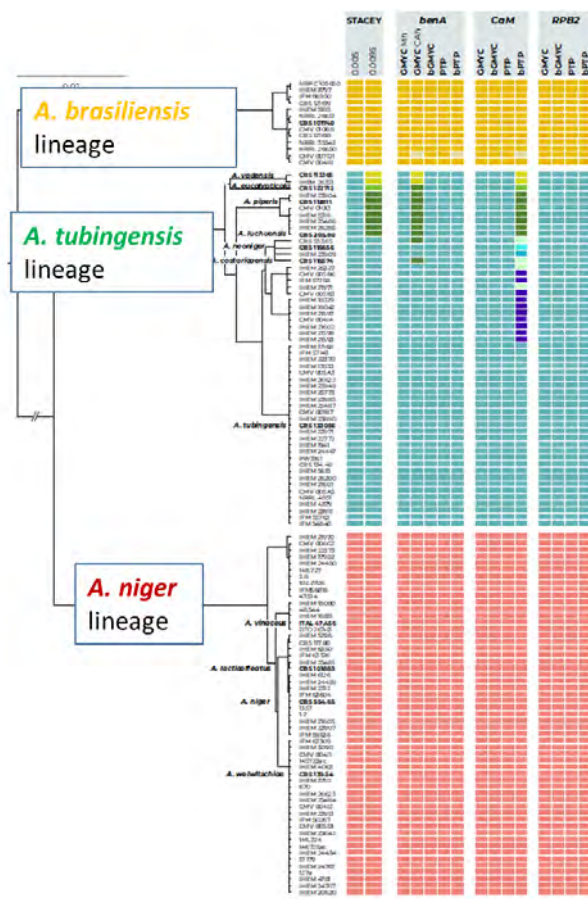


図 1. *Aspergillus series Nigri* の系統樹 (benA, CaM, RPB2 遺伝子)、STACEY と single-locus methods (GMYC, bGMYC, PTP, bPTP) による種の区分

2. 環境から分離された真菌の同定と *Aspergillus sydowii* 関連種の多系統合体モデルでの解析

ケニア国ナイロビの生活環境中から分離された真菌の同定を実施したところ、*Fusarium*、*Cladosporium*、*Alternaria* の検出率が高かった（表 1）。カビ毒の産生が認められている *Aspergillus* において、*b-tubulin* 遺伝子で種を同定したところ、*A. luchuensis* が多く検出された（表 2）。日本の住環境では *A. niger*、*A. fumigatus* が優先される。2 番目に多く検出された *A. sydowii* が含まれる series *Versicolores* において、series *Nigri* と同様の手法で分類の検討を実施し、17 種を 4 種に統合することを提唱した。

表 1. 住環境からの真菌の分離

属	頻度 (%)
<i>Fusarium</i>	79.7
<i>Mucor</i>	11.9
<i>Acremonium</i>	54.2
<i>Cladosporium</i>	69.5
<i>Alternaria</i>	66.1
<i>Aspergillus</i>	32.2
<i>Penicillium</i>	27.1
Yeast	47.5

表 2. 住環境からの *Aspergillus* の分類

属	株数 (株)
<i>A. luchuensis</i>	12
<i>A. sydowii</i>	3
<i>A. fumigatus</i>	2
<i>A. flavus</i>	1
<i>A. lentulus</i>	1
合計	19

3. ケニアの肺結核患者における慢性肺アスペルギルス症の調査

ケニアの肺結核患者における慢性肺アスペルギルス症（CPA）の血清学的証拠を提供することを目的に、4 つの病院で結核治療にもかかわらず肺結核感染の臨床的特徴が持続する患者から得た 234 のサンプルを分析した。分離された真菌は、マクロおよびミクロの形態学的同定を行い、*calmodulin*、*betatubulin* および ITS 遺伝子の配列分析により確認した。

② 成果（結果＋考察）

1. *Aspergillus niger* 関連種の多系統合体モデルでの解析

series *Nigri* に属する 276 株において *benA*、*CaM*、*RPB2* の 3 遺伝子のデータセットを用いて、4 つの単座法（*GMYC*、*bGMYC*、*PTP*、*bPTP*）と 1 つの多座法（*STACEY*）を含む多座合体モデルに基づく系統解析を実施した。合計 15 種類の手法とその設定から、11 種類の手法が 3 つの系統に対応する series *Nigri* 内の *A. niger*、*A. tubingensis*、*A. brasiliensis* 3 種のみを認識した。BLAST 解析で異なる遺伝子領域を解析した場合、単一遺伝子の系統間に矛盾が生じ、種の同定が異なることから、現在適用されている種の問題は維持できないことが示された。そこで、全ゲノム情報からランダムに 200 遺伝子を選び、それぞれ 20 遺伝子ずつ、計 10 回の *STACEY* 解析を行った（図 2）。その結果、*A. niger* と *A. brasiliensis* の系統では、すべての解析で 1 種のみが認識され、*A. tubingensis* の系統では 1~4 種が矛盾なく識別されることが確認された。これら結果と実際的な影響を考慮した結果、series *Nigri* に 6 種を含めることを提案した（図 3）。本分類においては、泡盛などの醸造に使用される黒麹菌 *A. luchunensis* は種として認識された。また、*A. niger* と *A. lacticoffeatus* など表現型は異なるが、同種となる種があった。

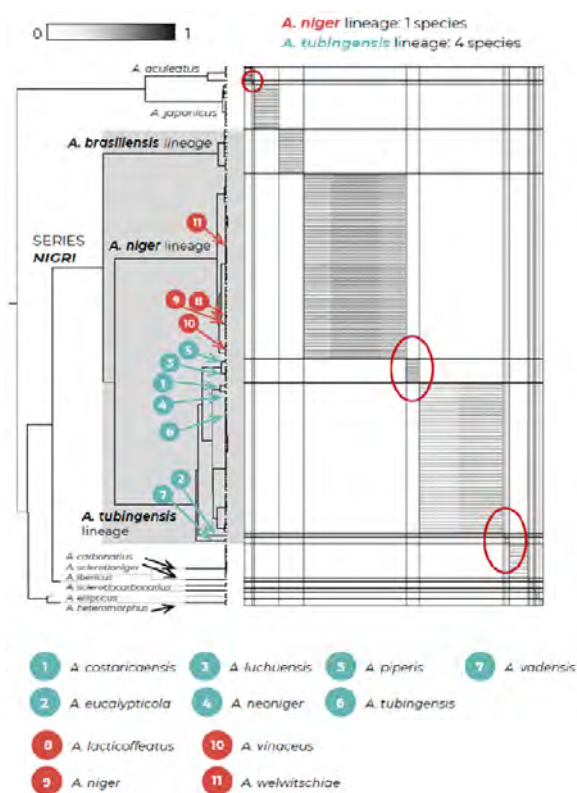


図 2. *Aspergillus* series *Nigri* における *STACEY* 手法による種の範囲の推定

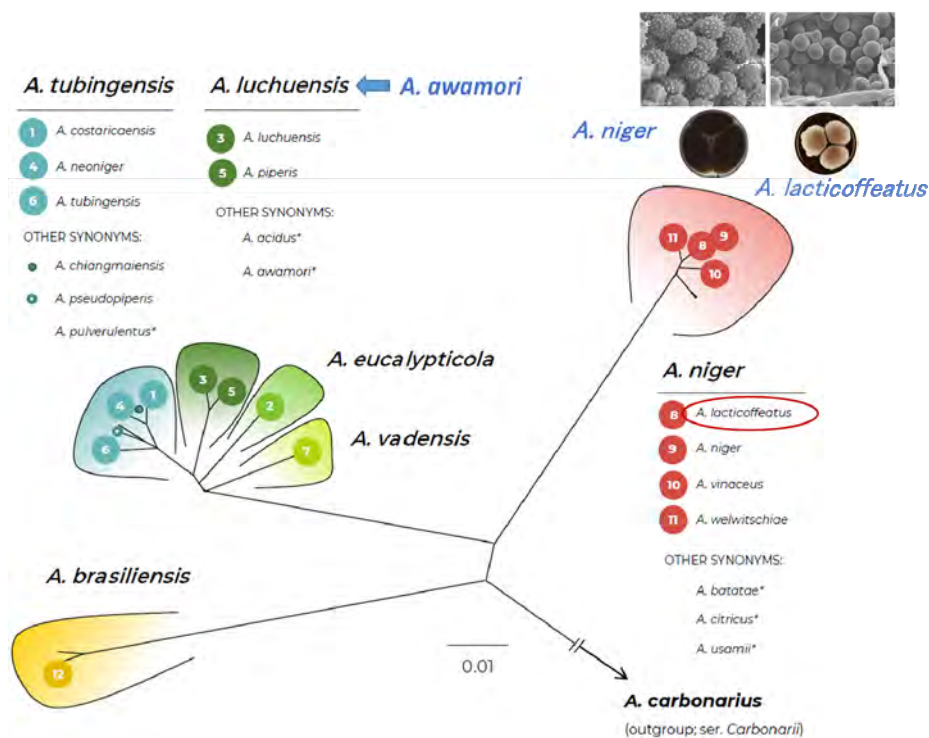


図 3. *Aspergillus* series *Nigri* における再分類 (Bian et al., Stud Mycol. 102: 95–132, 2022.)

2. 環境から分離された真菌の同定と *Aspergillus sydowii* 関連種の多系統合体モデルでの解析

ケニア国ナイロビの生活環境中から分離された *Aspergillus* のうち 2 番目に多く検出された *A. sydowii* が含まれる series *Versicolores* において、series *Nigri* と同様の手法で分類の検討を実施した。

5 つの遺伝子座 (*benA*, *CaM*, *RPB2*, *Mcm7*, *Tsr1*) に基づき、STACEY および 5 つの単座法 (*GMYC*, *bGMYC*, *PTP*, *bPTP*, *ABGD*) 系統解析を実施した (図 4)。ほぼすべての種区切りが広義の種概念を示唆し、一貫して支持された種は 4 種のみであった。以上の結果から、series *Versicolores* を *A. versicolor*, *A. creber*, *A. sydowii*, *A. subversicolor* の 4 種とし、残りの種は *A. versicolor* または *A. creber* のシノニム (偽名) にする提案をした。

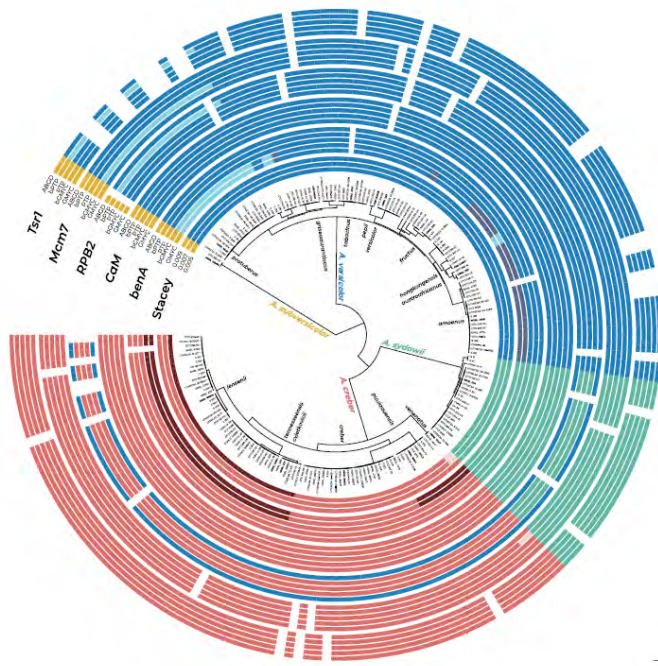


図 4. *Aspergillus* series *Versicolores* の系統樹 (Tsr1, Mcm7, RPB2, CaM, benA 遺伝子)、STACEY と single-locus methods (GMYC, bGMYC, PTP, bPTP) による種の区分

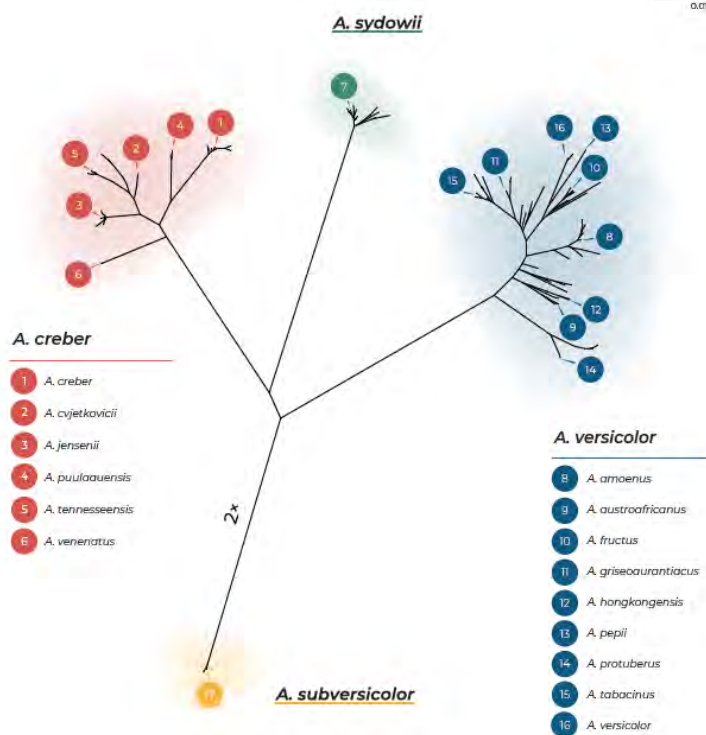


図 5. *Aspergillus* series *Versicolores* における再分類 (Sklenář et al, Stud Mycol. 102: 53-93, 2022.)

3. ケニアの肺結核患者における慢性肺アスペルギルス症の調査

肺結核は真菌感染症の重要なリスクファクターである。結核治療にもかかわらず肺結核感染の臨床的特徴が持続する患者から得た 234 の血清サンプルを分析した。血清学的に CPA または真菌の感作が確認されたのは 46 名 (19.7%) であり、喀痰の真菌学的検査では、88 名 (38%) が真菌培養陽性であった。このうち、*Aspergillus* 属が 25 (28%、*A. fumigatus* が 13 (14.8%)、*A. niger* が 8 (9.1%))、*Candida albicans* が 18(20.5%)であった。

結核治療にもかかわらず臨床症状が持続する患者には、再治療の前に CPA のための特異的アスペルギルス抗体検査と確定診断のための微生物学的検査を実施する必要がある。

③ 成果の公表

Bian C, Kusuya Y, Sklenář F, D'hooge E, Yaguchi T, Ban S, Visagie CM, Houbraeken J, Takahashi H, Hubka V. Reducing the number of accepted species in *Aspergillus* series *Nigri*. *Stud Mycol.* 102: 95–132, 2022.

Sklenář F, Glässnerová K, Jurjević Ž, Houbraeken J, Samson RA, Visagie CM, Yilmaz N, Gené J, Cano J, Chen AJ, Nováková A, Yaguchi T, Kolařík M, Hubka V. Taxonomy of *Aspergillus* series *Versicolores*: species reduction and lessons learned about intraspecific variability. *Stud Mycol.* 102: 53-93, 2022.

Mohamed A, Obanda BA Njeri HK, Loroyokie SN, Mashedi OM, Ouko TT, Gatumwa EM, Korir RK, Yaguchi T, Bii CC. Serological evidence of chronic pulmonary aspergillosis in tuberculosis patients in Kenya. *BMC Infect Dis.* 22:798-806, 2022.

6. 自己評価

本年度は主として、*Aspergillus series Nigri* および *series Versicolores* において、3 もしくは 5 遺伝子のデータセットを用いて、4 もしくは 5 の単座法と 1 つの多座法 (STACEY) を含む多座合体モデルに基づく系統解析を実施した。昨年までの検討では、*series Nigri* は 3 種に統合する結果であったが、さらに検討を加え、従来の経緯を踏まえた影響を考慮した結果、6 種とすることとした。*series Versicolores* においては、支持された種は 4 種のみであった。これらの結果は、*Studies in Mycology* (IF = 25.731) に 2 報、掲載された。また、KEMRI 所属の研究者と共同で、結核治療にもかかわらず臨床症状が持続する患者に対して、再治療の前に CPA のための特異的アスペルギルス抗体検査と確定診断のための微生物学的検査を実施することが有効であることを示した。

コロナ禍によりここ数年間、ケニアへの渡航が出来なかったが、今年度はケニアを訪問して共同研究者 Bii 先生にこれまでの結果を報告し、議論を行った。そのため、本プロジェクトは概ね実施計画どおり進展していると考えている。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由 (「6. 自己評価」で述べてあれば省略可)

「6. 自己評価」に記載。

令和4（2022）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：住血吸虫ライフサイクルにおける中間宿主に対する環境因子の影響
課題番号：2022-Kyoten-06

2. 代表者：王寺 幸輝（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 准教授）
共同研究者：吉川 正英（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 教授）
島田 賢子（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 教務職員）
濱崎 めぐみ（長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 技術職員）
中村 梨沙（長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 助教）
濱野 真二郎（長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 教授）

3. 決定額：1200 千円

4. 研究計画

① 研究目的

住血吸虫症は、世界で 2 億人以上の罹患者を有する世界三大寄生虫病の 1 つである。「住血吸虫」は、淡水に生息する巻貝を中間宿主とし、終宿主に経皮感染する。世界的には特効薬プラジカンテル PZQ による集団薬剤投与 MDA と住民への啓発活動による感染制御策が講じられているが、完全に制圧するには、かつて本邦での日本住血吸虫症の撲滅にみるように中間宿主に着目し、住血吸虫のライフサイクルを断ち切ることが肝要である。しかしながら、中間宿主（貝）内における住血吸虫の幼虫発育は未解明な点が多く、ヒトへの感染形態であるセルカリアへの発育メカニズムを解明することが特に重要と考えられる。我々は、本申請研究にて、人工的なライフサイクルで生育する『貝』と、実際に感染伝播が成立している自然環境中の中間宿主『貝』に着目し、幼虫発育環境への影響を精査することで、宿主貝の地域性や住血吸虫幼虫の発育との関連性（環境特異性）を解明することを目的とした。

② 研究内容

住血吸虫モデルとして、マンソン住血吸虫 *S. mansoni*（奈良医大株、長崎大・熱研・寄生虫株、ケニア拠点株）および中間宿主の巻貝 *B. glabrata*（奈良医大株、長崎大・熱研・寄生虫株、ケニア拠点株）を用いて、実験室内で動物（ICR マウス）に感染させ、基盤となるライフサイクルを維持する。特に、ケニア拠点株については、アジア・アフリカ感染症研究施設の 1 つであるケニア拠点（Mbita station）周辺に存在する *S. mansoni* 媒介貝を現地採取し、生物多様性条約をクリアした後、国内に輸送し、奈良医大および長崎大・熱研・寄生虫の感染動物実験施設内にて維持する。住血吸虫株／貝株の組合せにより、*S. mansoni* 感染後の *B. glabrata* 内での幼虫の発育過程（スポロシスト、娘スポロシスト、セルカリア）を薄切切片等により精査し、株間による感染抵抗性等を詳細に解析する。また、各 *B. glabrata* 株より細胞抽出成分（BGP）を調製し、各

*S. mansoni*株感染マウスより誘導したスポロシストに BGP を添加することで、*in vitro* 培養系で各種株間における幼虫発育への影響 (viability、運動性、発育性等) を精査し、宿主貝の環境 (地域性) および住血吸虫の発育との関連性 (環境特異性) を解析する。

貝内で発育する *S. mansoni* の解析には、長崎大学動物実験施設内に設置された 2 光子励起顕微鏡を熱研との共同研究に活用する。なお、熱研・寄生虫学で維持されている *B. glabrata* および BGP は、熱研との共同研究により使用可能となり、ケニア産感染貝の採取および BGP 抽出には、ケニア拠点 (Mbita station) への渡航・フィールド活動が必要である。また、研究進捗状況の打ち合わせを長崎大学・熱研および奈良県立医科大学で行う予定である。

③ 予想される成果

ヒトへの感染形態であるセルカリアの発育メカニズムの解明は、住血吸虫のライフサイクルの中でも特に注視すべきステージと考えられる。我々が本研究にて提案する中間宿主に対する環境因子の影響を詳細に解析することで、様々な株間での違いから、住血吸虫の発育を阻止可能な因子を見出すことが可能と考えられ、感染形態であるセルカリアの発生を阻止可能な発育阻害薬剤の開発や、貝を駆除せずして感染制御を実現することにも繋がるのが予想される。これまでに、感染貝の疫学的調査はあるものの、本研究計画のように貝の生物学的知見に基づいた研究は、世界的にみても例がない。

また、本研究モデルとしては、マンソン住血吸虫をモデルとして扱うが、世界で蔓延するその他の住血吸虫 (ビルハルツ住血吸虫、日本住血吸虫、メコン住血吸虫等など) にも応用可能な実験系であり、種々の環境因子の解明を念頭に置き、住血吸虫発育のコントロールや発育阻害に対するスクリーニング、また、貝の駆除を行わずに感染コントロールできる可能性も秘めており、生態系を乱すことなく、自然環境への配慮も可能と考えられ、本研究が住血吸虫症の感染制御と防圧に十分貢献できると確信し、申請に至った。

5. 実施報告

① 令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

■ 感染貝におけるマンソン住血吸虫の分布解析

マンソン住血吸虫 (*S. mansoni*) は、ICR マウスにセルカリアを感染させ、8 週間後に摘出した肝臓より虫卵を回収し、孵化させたミラシジウムを淡水巻貝 (*B. glabrata*) に感染させ、飼育を開始した。経時的に 4%PFA にて固定し、凍結切片を作成後、H&E 染色、抗マンソン住血吸虫抗体を用いた免疫染色により貝内における *S. mansoni* の分布を詳細に解析した。

■ 貝由来抽出物 (BGP) によるマンソン住血吸虫の発育への影響

未感染 *B. glabrata* より各種臓器（頭足 HF、櫛鰓 Ct、心臓 Hr、肝臓・卵精巢 HPOT）に分割後、セラミックビーズにより組織粉碎し、遠心分離後の上清分画を貝由来抽出物 (BGP) とした。

S. mansoni 感染マウス肝臓より摘出後、虫卵を精製し、ミラシジウムに孵化後、*in vitro* 培養を行った。培養は、Bge-M 培養液を用い、28°C の温度で行った。*S. mansoni* ミラシジウムの *in vitro* 培養系に各種 BGP を組み合わせることで添加培養を行い、経時的にミラシジウムの形態、動態 (viability) を調べた。

■ ケニアにおけるマンソン住血吸虫と宿主貝生育環境調査

アジア・アフリカ感染症研究施設の 1 つであるケニア拠点周辺での *S. mansoni* 媒介貝株の樹立を目指し、ビタ拠点、クワレ拠点周辺におけるフィールド調査を行った。各ポイントの貝分布調査を行い、拠点ラボに移送後、感染状況を精査した。

② 成果（結果＋考察）

■ 感染貝におけるマンソン住血吸虫の分布解析

S. mansoni を感染させた *B. glabrata* を経時的（感染後 10 日目、56 日目）に固定し、凍結連続切片を作成後、H&E 染色および免疫染色により虫体の分布を解析した (Fig. 1A)。その結果、感染 10 日目は同貝の頭足部 HF に局在し、櫛鰓 Ct や心臓 Hr の一部に存在するのみであった (Fig. 1B)。一方で、感染 56 日目では、主に同貝の肝臓 HP、卵精巢部 OT に存在することが明らかとなった (Fig. 1B)。

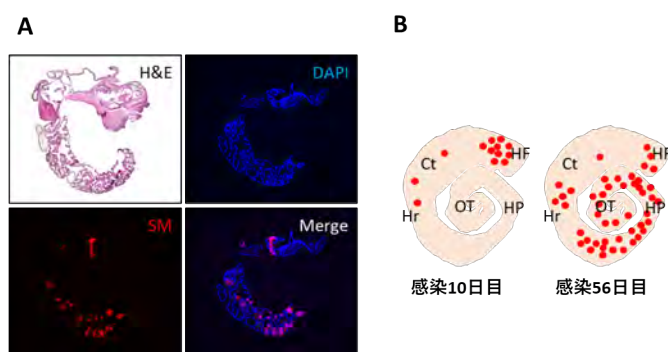


Fig. 1.

■ 貝由来抽出物 (BGP) によるマンスン住血吸虫の発育への影響

未感染 *B. glabrata* より各種臓器 (Ct、Hr、HPOT、HF) 由来抽出物 (BGP) を調製後、ミラシジウムの *in vitro* 培養系に各種 BGP を添加し、7 日間培養した結果、Ct 由来 = Hr 由来 < HPOT 由来 < HF 由来 BGP の順で、運動性維持を認めた。そこで、HF および HPOT 由来 BGP を用いて経時的に、様々な組み合わせで (Fig. 2A)、28 日間培養を行った。その結果、HF を 14 日間添加後、さらに HPOT を 14 日間添加する条件 (㊸) が最も viability の維持が可能と考え (Fig. 2B,C)、その条件下で培養した住血吸虫の一部では内部に娘スポロシストを有する構造が認められた (Fig. 2C)。

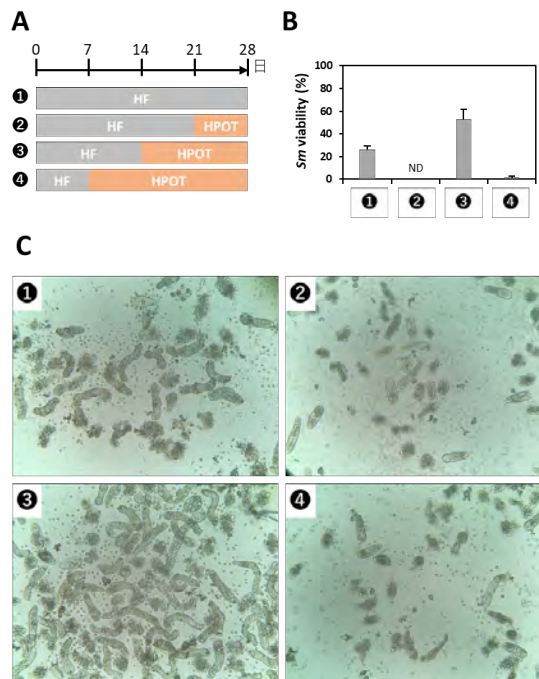


Fig. 2.

■ ケニアにおけるマンスン住血吸虫と宿主貝生育環境調査

ケニア・ビクトリア湖畔のビタ拠点においてフィールド調査を行い (Fig. 3A)、ラボに持ち帰り感染貝の有無を確認した (Fig. 3B)。

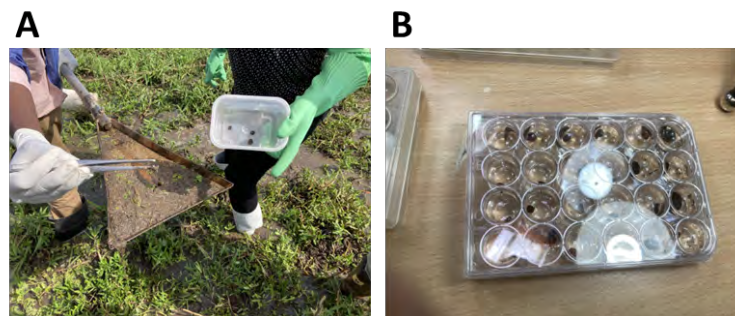


Fig. 3.

更に、クワレ拠点周辺におけるフィールド調査を行い、ポイント毎の貝分布調査 (Fig. 4A) 及び、それぞれの感染状況を実体顕微鏡により調査した (Fig. 4B)。

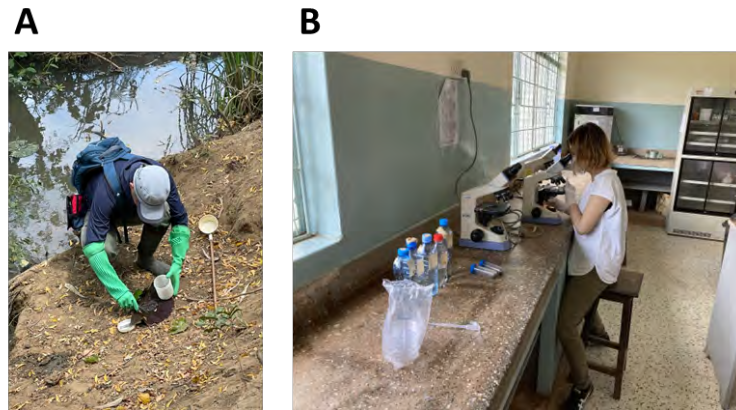


Fig. 4.

③ 成果の公表

1. O uji Y, H amasaki M, M isu M, K itamura T, H amano S, Y oshikawa M.
Schistosoma mansoni larvae *in vitro* cultures using *Biomphalaria glabrata* extracts.
Acta Trop. 2022 Nov;235:106636. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106636.
Epub 2022 Aug 6.
2. 西村知子、渡部一貴、中谷敏也、菊池英亮、三須政康、北村知嵩、根津大樹、山 一
郎、高濟峯、笠原敬、王寺幸輝、吉川正英.
肝被膜下出血, その後に好酸球増多, 蕁麻疹出現を認めた肝蛭症の1例
Clinical Parasitology, 33(1), 79-83 (2022).
3. 王寺幸輝¹、北村知嵩¹、三須政康¹、西村知子¹、島田賢子¹、濱崎めぐみ²、中村
梨沙²、濱野真二郎²、吉川正英¹ (¹奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学、
²長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学)
貝を用いない *in vitro* 住血吸虫培養システムの開発
第91回 日本寄生虫学会 (2022年5月、帯広市)
4. 王寺幸輝¹、濱崎めぐみ²、北村知嵩¹、三須政康¹、島田賢子¹、中村梨沙²、濱野
真二郎²、吉川正英¹ (¹奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学、²長崎大学 熱
帯医学研究所 寄生虫学)
感染能を有する住血吸虫卵保存法の開発
第92回 日本寄生虫学会 (2023年3月、金沢市)

また、上記の成績をまとめ論文執筆を進めている。

6. 自己評価

中間宿主を有する寄生虫のライフサイクルを実験室レベルで実現するには、宿主(中間宿主、終宿主)の維持や感染実験など多数のプロセス・操作が必要である。しかし、一般的に、中間宿主体内における寄生虫の発育状況の観察や解析は容易ではない。我々は、これまでに住血吸虫をモデルとした *in vitro* ライフサイクルの実現を目指して、中間宿主(貝)を使用しない培養系における発育実現を試みている。

本研究では、中間宿主 *B. glabrata* 内における *S. mansoni* 幼虫期の発育動態の詳細を経時的に解析した結果、感染初期と後期では、明らかな分布領域の差異が認められた。これらの成績は、幼虫ステージにおける臓器由来因子の貝内発育に関わる可能性を示唆している。とりわけ、感染初期では頭足(HF)、感染後期では肝脾臓・卵精巣(HPOT)の領域における分布が顕著であったことから、それら抽出物(BGP)の影響を *in vitro* 培養系で精査した。その結果、各抽出物が *viability* の維持や発育に重要な因子であることを立証することができた。

また、宿主貝の地域性や住血吸虫幼虫期発育との関連性を調べるため、ケニア拠点において感染地域に分布する媒介貝の調査研究を行った。その結果、それらのフィールド研究により、貝の分布域や感染率が明らかとなった。現地で採取した貝については、ビタ拠点における飼育準備が整いつつある。今後は、飼育条件の最適化や、ヒトー貝の間で実際に感染伝播が成立している環境を *in vitro* 培養系により模倣することで、住血吸虫幼虫発育環境の影響が解析できると考えている。

7. 達成度(何れかに○)

- I (所期の成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由(「6. 自己評価」で述べてあれば省略可)

令和 4（2022）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ケニアにおけるイエカ属蚊の種構成およびウイルス相に関する研究
課題番号：2022-Kyoten-08
2. 代表者：前川芳秀（国立感染症研究所昆虫医科学部，主任研究官）
共同研究者：井上真吾（長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点，教授）
糸川健太郎（国立感染症研究所昆虫医科学部，主任研究官）
Dida O Gabriel（The Technical University of Kenya, Lecturer）
3. 決定額： 1,200 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

遺伝学的種同定法の発達により，形態学的には分類できない種においても種同定が可能となった．この方法は，採集で傷つき種同定が不可能であった個体に対しても種同定が可能であるが，種同定には，正確に種同定された個体の遺伝子情報と比較する必要がある．アフリカ南東部のマラウイ共和国で報告されたイエカ属の蚊には，サハラ砂漠以南で生息が確認されていない種が含まれ，この種を含む *Cx. univittatus* complex は West Nile virus や Rift Valley fever virus 媒介蚊であることが知られている (Maekawa et al., 2021)．ケニアから登録された *Cx. univittatus* complex の COI 遺伝子には，未知の種である可能性が示唆された遺伝子も含まれており，種の確認が急務である．本調査研究では，*Cx. univittatus* complex を含むイエカ属を対象として，蚊採集，種の分類同定（形態と遺伝子）と記載，採集蚊からのウイルス検出を目的とする．本研究で用いる遺伝子学的分類法は，Itokawa et al., (2019) が開発した NGS を用いた超高精細遺伝子解析法を併用し，COI 遺伝子では分類できない種にも対応できるようにした．

②研究内容

ケニア国内における *Cx. univittatus* complex などのイエカ属の採集記録 (Ajama et al., 2016) は，Mbita 周辺地域から報告されているため，フィールド採集調査はケニア拠点の Mbita ラボを使用する．サンプル採集は成虫と幼虫を対象として行い，幼虫は成虫まで飼育する．採集した成虫は，個体ごとに形態学的分類法で種同定を行い，種単位でソーティングし，ナイロビのラボでウイルス検出を行う．NGS と COI 遺伝子による解析は，サンプルを日本に持ち帰り Itokawa et al., (2019) と Maekawa et al., (2021) に従って行う．解析には，採集状態の良い成虫個体と幼虫飼育後に羽化した成虫個体を使用する．これら解析用サンプルは，現地で種同定後に乾燥ピン標本作製し，標本箱に収納して保管する．また，遺伝学的解析で変異が見つかった

た個体は、標本の外部形態を確認し、形態学的にも変異がないか既知の種と比較する。

③予想される成果

本研究を通して得られると予想される成果は、採集地域の蚊相、未記録種の確認とその分布、形態学的・遺伝学的変異種の有無、蚊媒介性ウイルスの種類である。イエカ属によって媒介される感染症は、人獣共通感染症として人的被害に留まらず家畜や野生動物にとっても大きな脅威となっている。本調査研究で蚊相からウイルス検出まで行うことは、調査地域において、これまで知られていなかった蚊種や蚊媒介性感染症を発見できると期待される。この事は、研究成果の地域への還元に繋がり、熱帯地域における複雑多様な疾病感染環の解明と防除に寄与できると考えている。

5. 実施状況報告：

①令和4（2022）年度実施計画に対する実施状況

a. ケニアでの蚊類採集

2022年11月21日から26日までMbita周辺の5地区でイエカ属を含む蚊類の採集を行う計画であったが、調査地で申請者を含む調査者ら3名のコロナ陽性が判明したため、計画を1日短縮した。実施した採集調査は、現地共同研究者により事前に選定された4地区において11月21日から24日まで行った。

蚊の採集は、CDCライトトラップを用いて行い、トラップは調査許可を得た各村5軒の家屋と動物舎に16時から翌朝6時まで吊り下げた。採集蚊は、保冷剤と共にクーラーボックスに保管し、NUITMのMbitaラボに持帰って-80℃のフリーザで保管した。種同定とソーティングは、主にEdwards (1941)に従って形態学的種同定を行った。

b. 採集蚊のCOI遺伝子解析

Culex sp.など、形態では種の区別がつかない個体を用いてCOI遺伝子解析を行った。

c. *Cx. univittatus* complexのNGS解析

合計56個体の脚1-2本についてDNAを抽出し、Multiplex PCRによるあらかじめ選抜された48座位の増幅とそれらについてNGSによる遺伝子型の解析を行った。その内訳は、*Cx. univittatus* complex 45個体、*Mansonia* sp. 9個体、*Anopheles* sp. 2個体とした。*Mansonia* sp.と*Anopheles* sp.は、実験系評価のために加えた。取得した配列について、各遺伝子座位の遺伝子型の解析及び結合した配列による系統解析を行った。

d. 採集蚊からのウイルス分離および検出

今回採集した蚊の合計 3 属 9 種 1,297 個体 (87 pools, 1~20/ pool) の内、27 プールをビーズクラッシャーにて粉碎し乳剤にし、0.45 μ m フィルターにてろ過した後 2 種類の株化細胞 (ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞およびアフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞) に接種し、盲目継代を 2 回以上繰り返して培養し、CPE (細胞変性効果) の出現を目安としてウイルス分離を試みた。

②成果 (結果+考察)

a. ケニアでの蚊類採集

採集は Homabay 3 地区 (Gode Ariyo, Wanga, Angalo), Sindo 1 地区 (Kaungudi) で行った。その結果、6 属 21 種 1,497 個体 (sp.含) を採集した (表-1)。 *Culex* 属の蚊が最も多く採集され、次いで *Mansonia* 属、*Anopheles* 属であった。種では、*Cx. antennatus* が最も多く採集され、全体の 74% を占めていた。 *Culex univittatus complex* (*Cx. univittatus*, *Cx. neavei*, *Cx. perexiguus*) は、Homabay 地区でのみ採集され、合計で 121 個体を得た。

採集場所による種構成にも差異が見られ、Homabay 地区では *Culex* 属と *Mansonia* 属で構成されているが、Sindo 地区は *Culex* 属と *Anopheles* 属であり、特に *Anopheles* 属の占める割合が高かった。Homabay 地区と Sindo 地区ともにビクトリア湖に面しているが、採集された蚊類の種構成が異なるため、生息環境を精査し、種構成の異なる要因を明らかにする必要がある。その要因が分かれば、蚊類の分布予測にも活用できるため、将来的には感染症の流行予測にも活用できる。

本調査では、幼虫採集は実施できなかった。計画では、フィールド調査最終日に行う予定であったが、調査者らのコロナ陽性が判明し、調査を中止したためである。

b. 採集蚊の COI 遺伝子解析

Culex sp.としてまとめたサンプルは、主に種同定に必要な外部形態が欠損し種同定が行えない個体である。しかし、その中には *Cx. univittatus complex* と思われる個体も含んでいるため、種の確認のために COI 遺伝子解析を行った (図-1)。さらに *Mansonia* 属では、種同定用の検索キーとは異なる個体が含まれていたため、COI 遺伝子解析を行った (図-2)。

図-1 に示す 12 個体 (*Cx.* K-XX) が、*Cx. univittatus complex* あるいは近縁種である結果が得られた。ケニアで採集され GenBank に登録されている *Cx. neavei* (KU380473) の種同定が正しいとすれば、*Cx. univittatus* (KU380475) のクラスターは、未知の *Cx. univittatus complex* の種である可能性が高いと考えている。何故なら *Cx. neavei* like M215&216 は、申請者がマラウイで採集し *Cx. neavei* と種同定したサンプルであるが、COI 遺伝子で比較したところ、*Cx. neavei* (KU380473) とは異なるクラスターを形成したため、未知の *Cx. univittatus complex* の種である可能性があると考えているからである。

図-2 に示す *Mansonia* sp.の内、赤印をつけた 4 個体は、特に脚部の模様が検

索表に記載されている *Ma. africana* と異っており、別種と思われた。解析の結果、4 個体中 3 個体は検索表と同じ特徴を持つ *Ma. africana* とは異なるクラスターを形成した。一方で、3 個体のクラスターには先行研究で *Ma. africana* として登録されている個体も含まれているため、ある地域にみられる個体差ではなく、ビクトリア湖畔に広く分布し個体数も多いと推察された。しかしながら、先行研究としてケニアから GenBank に登録されている KU380XXX の COI 配列は (Ajama et al., 2016)、誤同定と思われるサンプルも少なくない。そのため、サンプル数を増やし、幼虫～羽化成虫までの完全標本を準備して形態同定の質を向上させ、さらに COI 遺伝子を整備する必要がある。

c. *Culex univittatus* complex の NGS 解析

今回解析した蚊個体の内、*Mansonia* 属および *Anopheles* 属の蚊については、十分な数のアンプリコンが得られなかった。これは、今回用いたプライマーセットが *Culex* 属、*Aedes* 属の蚊の配列からデザインされたことから期待される結果ではあった。

Culex univittatus complex の蚊について得られた各遺伝子座位のアレルをそれぞれ一つずつ結合したコンカカテマーを作成し、系統解析を行った (図-3)。興味深いことに、形態的に同定された *Cx. univittatus* complex の各種について、一個体 (sample no. 8) を除けば明確な構造は見いだせなかった。また、各遺伝子座位の遺伝子型を用いて主成分分析によるクラスター解析を行った (図-4) が、sample no. 8 の個体が大きく遺伝子型が異なる以外はその他の個体について明確な違いを見出すことができなかった。これらの結果から、ケニアにおいて *Cx. univittatus* complex のそれぞれの種について、形態的な定義と遺伝学的な集団の関連について再考が必要であると考えられる。

d. 採集蚊からのウイルス分離および検出

27 プールからのウイルス分離を試みた結果、*Ma. uniformis* の 1 プール、*Cx. antennatus* の 3 プールから C6/36 細胞に対して CPE を示したため、継代を 4 回繰り返して CPE の再現性を確認した。これら 4 プールはいずれも吸血した蚊のプールであったため分離ウイルスが蚊の体内に存在したものか、吸血した血液中に存在したのかについては不明である。更にアルボウイルス (蚊だけでなくヒトおよび哺乳類にも感染性を持ち蚊の吸血等によって伝搬するウイルス) なのか蚊のウイルス (蚊の間でのみ感染性を持つウイルス) なのかは現段階では不明である。

今後、フラビウイルス共通プライマー、トガ・アルファウイルス共通プライマー、ブニavirus共通プライマー等各種アルボウイルスを網羅する RT-PCR にてウイルスの種別同定を進め、さらに DNA シーケンスによって系統樹解析等を行っていききたい。いずれの共通プライマーにおいても検出できなかった場合は、NGS 解析にて同定したい。

e. 図表

表-1 ライトトラップ法で捕集した種と数

Genus	species	Homabay			Sindo	Total
		Gode Ariyo 20221121	Wanga 20221122	Angalo 20221123	Kaungudi 20221124	
Anopheles	<i>gambiae</i> s.l.			12	24	36
	<i>pharoensis</i>			2		2
	<i>funestus</i>		1			1
	<i>ziemanni</i>			1		1
	sp.	4	12			16
Culex	<i>antennatus</i>	76	422	582	29	1109
	<i>univittatus</i>	1	48	19		68
	<i>neavei</i>	17	19			36
	<i>perexiguus</i>		13	4		17
	<i>cinereus</i>		3	1	8	12
	<i>philipi</i>	6				6
	<i>quinquefasciatus</i>				2	2
	<i>striatipes</i>	2				2
	<i>terzii</i>	1				1
	sp.	11	43	1	2	57
Aedes	sp.	2	2	8	2	14
Mansonia	<i>uniformis</i>	69	8	2		79
	<i>africana</i>	11	16	2		29
	sp.	5	1			6
Coquillettidia	sp.	2				2
Ficalbia	sp.			1		1
Total		207	588	635	67	1497

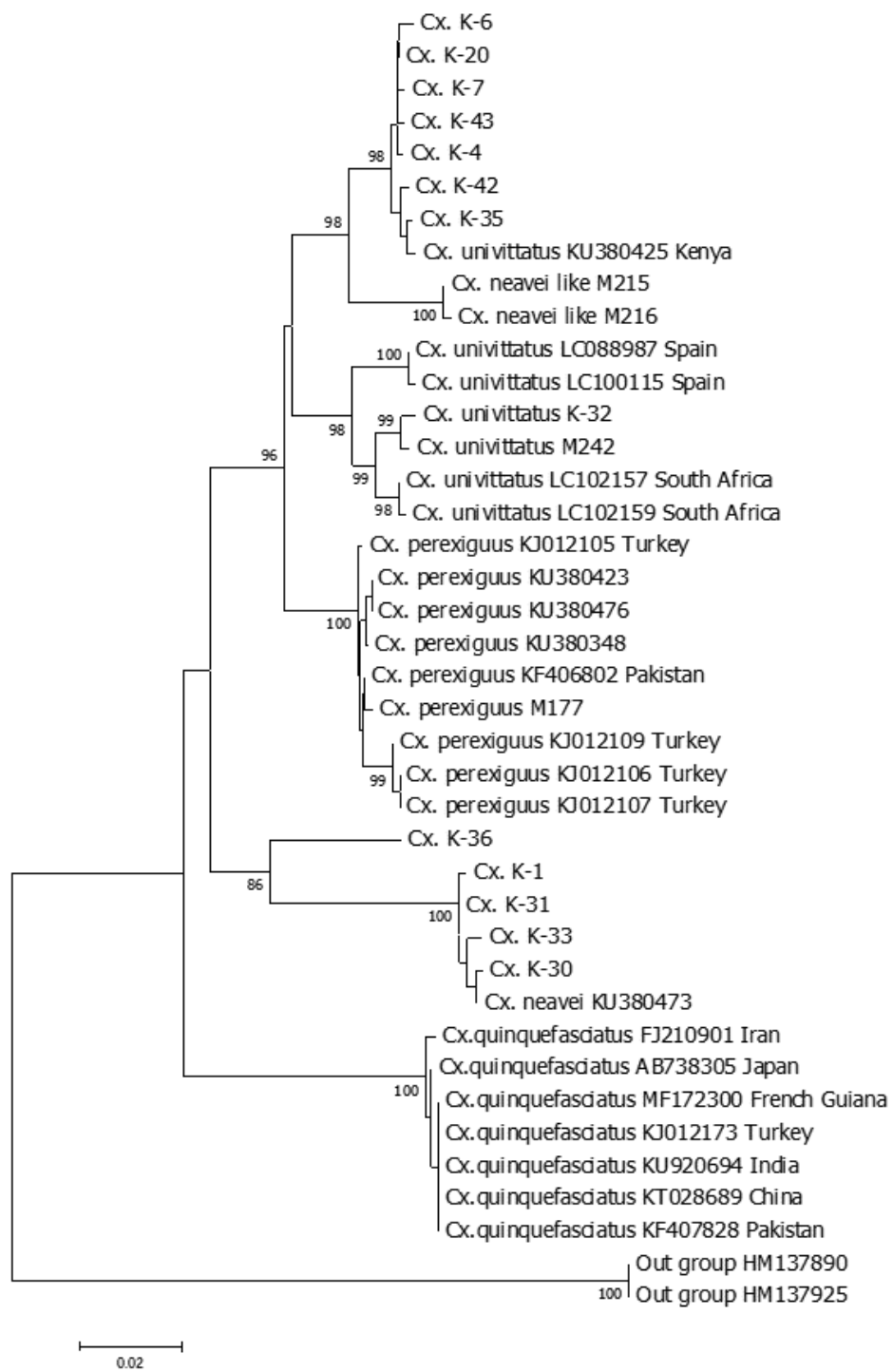


図-1 *Culex* sp.の COI 遺伝子配列を用いた系統樹解析結果 (658bp, NJ 法)

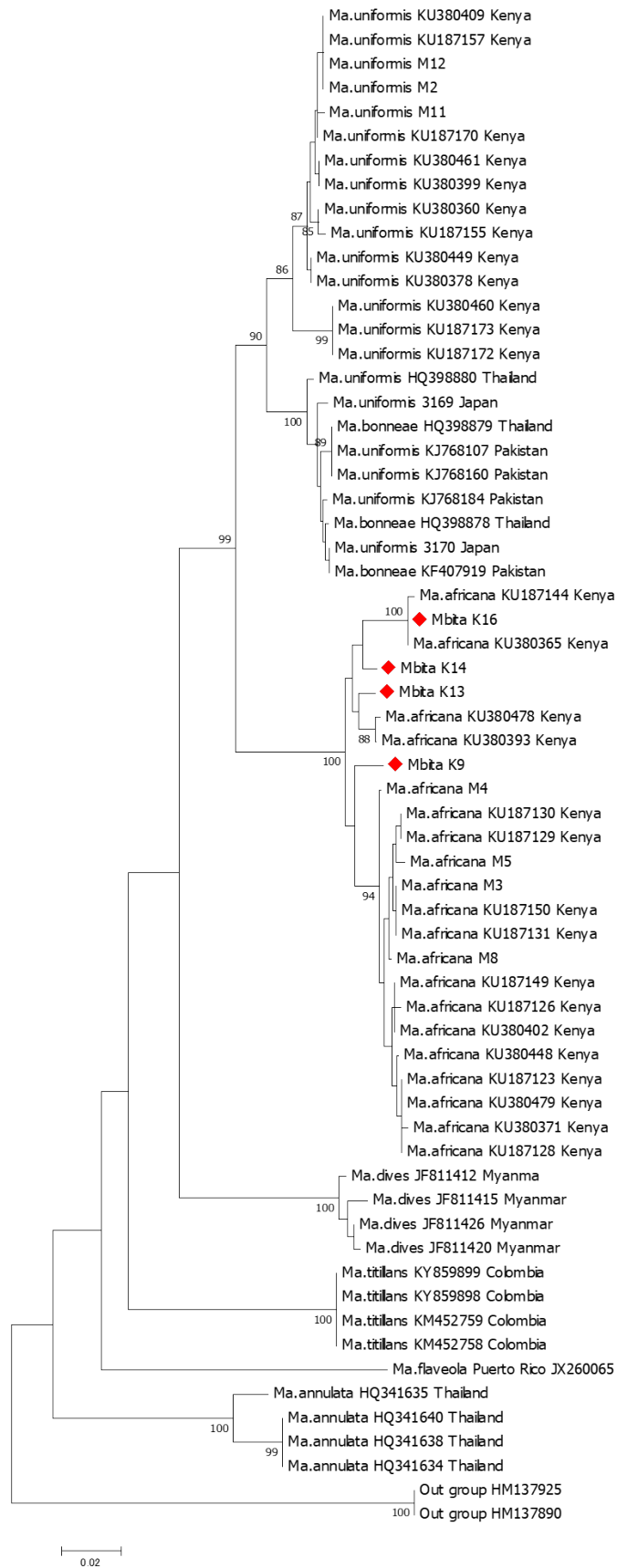


図-2 *Mansonia* 属の COI 遺伝子配列を用いた系統樹解析結果 (468bp, NJ 法)

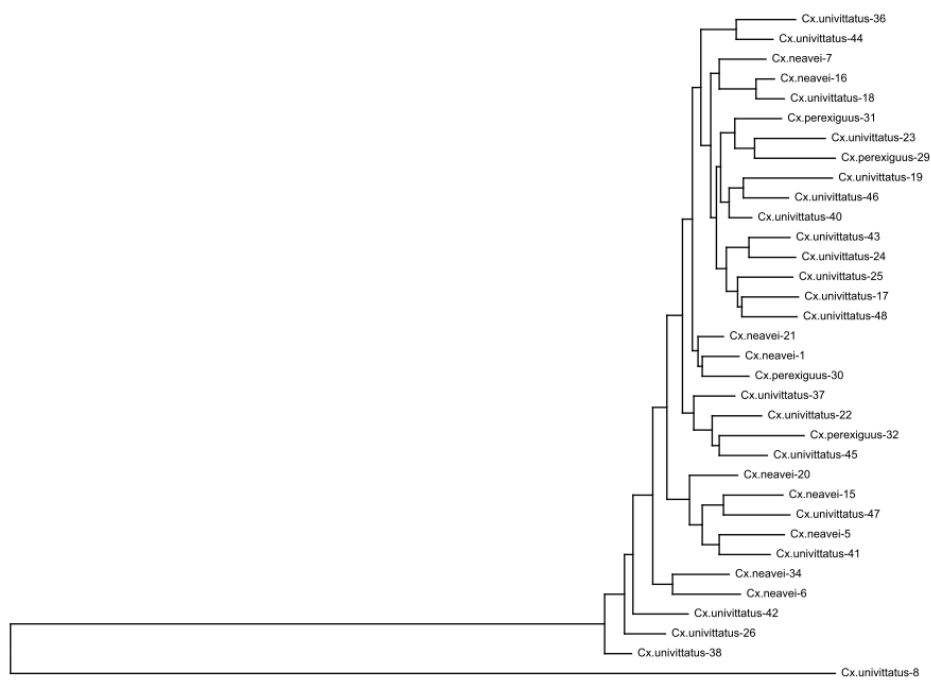


図-3 ケニヤで採集された *Cx. univittatus* complex の複数座位配列による ML 系統樹

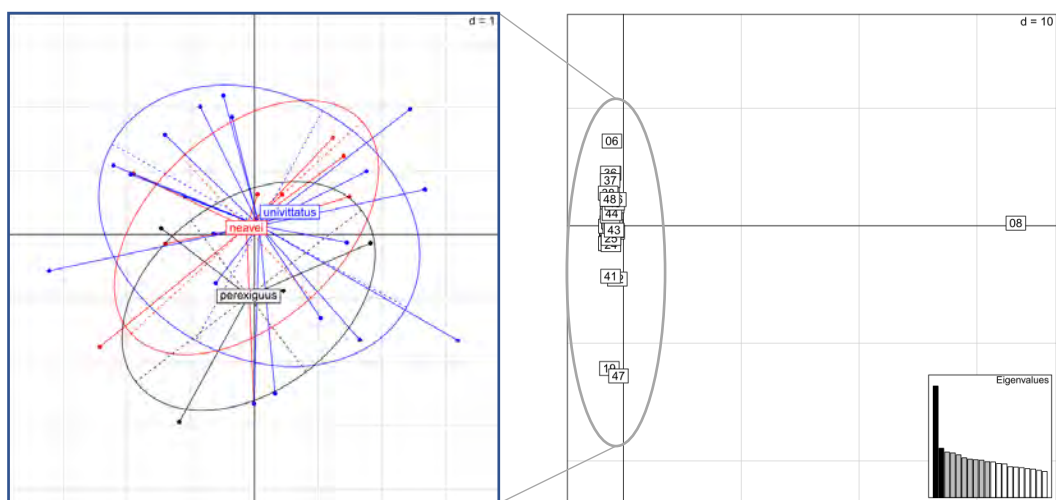


図-4 ケニヤで採集された *Cx. univittatus* complex の遺伝子型によるクラスタリング

③成果の公表

現時点では公表していないが、すべての解析結果をまとめてからの公表を考えている。

6. 自己評価

予想外のトラブルが起き、採集調査を短縮せざるを得なかったが、おおむね計画通りに実施できた。一方、ケニアで蚊の採集を行う最適な時期は4, 5月である。この時期は日本式のルールでは、予算執行と調査実施が難しい時期であるが、何らかの対策を講じて、より効果的な調査研究を行い、研究成果を現地へ還元したいと考えている。主な成果を下記に示す。

- a. 未知の種の存在を確認した
- b. 採集地による種構成の違いが分かった
- c. 新規のNGS解析方法の確立
既存の方法では蚊1個体を使用するが、本研究では脚数本で行う方法を確立した。
- d. 採集蚊からのウイルス分離
現在も継続中。陽性サンプルについては6月以降にさらに精査を行う。
- e. その他
ビタならびにナイロビのNUITMスタッフとの情報交換
糸川先生による現地スタッフへのNGS解析指導（ナイロビ）

7. 実施度（何れかに○）

- I （実施計画を実施していない。）
- II （実施計画どおり進展していない。）
- III （実施計画どおり進展している。）
- IV （実施計画以上の成果が得られている。）

評価を下した理由（6の自己評価で述べてあれば省略して良い）

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿（令和4年度）

区分	氏名	所属・職名
学外委員	かわづ しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・センター長
	まつもと そうきち 松本 壮吉	新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授
	◎にしぞの あきら 西園 晃	大分大学医学部・教授（副学長）
	みやざわ たかゆき 宮沢 孝幸	京都大学医生物学研究所・准教授
	あ と まなぶ 阿戸 学	国立感染症研究所・感染制御部・部長
	さ さ き き と し 佐々木 敏	東京大学大学院医学系研究科・教授
	ひ が ゆ き こ 比嘉 由紀子	国立感染症研究所・昆虫医科学部・第一室長
	み さ ご ちづる 三 砂 ちづる	津田塾大学 学芸学部 多文化・国際協力学科・教授
学内委員	ないとう まりこ 内藤 真理子	長崎大学医歯薬学総合研究科・教授
所内委員	やまもと たろう 山本 太郎	長崎大学熱帯医学研究所（環境医学部門）・教授
	ありよし こうや 有吉 紅也	長崎大学熱帯医学研究所（臨床研究部門）・教授
	かねこ さとし 金子 聡	長崎大学熱帯医学研究所（アジア・アフリカ感染症研究施設）・教授
	はせべ ふとし 長谷部 太	長崎大学熱帯医学研究所（アジア・アフリカ感染症研究施設）・教授
オブザーバー	かねこ おさむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・所長
	はまの しんじろう 濱野 真二郎	長崎大学熱帯医学研究所・副所長（運営管理担当）

◎印は議長

長崎大学熱帯医学研究所

令和5年10月発行

〒852-8523 長崎市坂本1丁目12-4

電話番号 (095)819-7803

F A X (095)819-7892

ホームページ <https://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/nekken/>