

NIBS LETTER 2012 MARCH
No. 573

日生研たより

2012年(平成24年)3月号 第58巻第2号(通巻573号)

挨拶・巻頭言

歴史に学ぶ

.....布谷鉄夫(2)

獣医病理学研修会

第50回 No.1021 馬の蹄叉

.....JRA 総研(日競研)(3)

レビュー

牛ウイルス性下痢ウイルス非構造蛋白質と
宿主細胞因子との相互作用

.....明石博臣(4)

アピコンプレクス門原虫が産生する植物
ホルモン様物質とその作用

.....永宗喜三郎(12)

お知らせ

編集後記.....(16)



NIBS

財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.gr.jp/>

歴史に学ぶ

布谷鉄夫

今冬も各地で記録的な低温や降雪による被害に見舞われ、自然災害が続いている。昨年来関東圏では有感地震が多く発生し、先日はM7級の首都直下地震の起こる確率が4年以内に70%という研究結果が大きく報道されたこともあり、昨年の東日本大震災時の巨大津波による無惨な映像がしばしば思い出される。日々報道される被災者の厳しい生活環境や今尚行方不明者の捜索が続けられている現状を見聞きするたびに胸が痛む。また、福島第一原子力発電所の事故は懸念されてきた原発震災が現実のものとなり、計り知れない被害と恐怖・混迷を与えている。科学技術の極致とも言われていた原発であるが、今回の事故は近代文明のもとに形成された安全神話の理念の限界をまざまざと見せつけた出来事であった。電力の大量消費社会を支えるべく効率性を追求し続けてきた結果でもあり、その利便を享受してきた筆者にとっても自身の生活様式を直視し直す機会となった。今回の大震災や原発事故について想定外という言葉をよく耳にするが、これほどの被害に至らずしも過去の歴史から学び、多少なりとも減災はできなかったのだろうか。

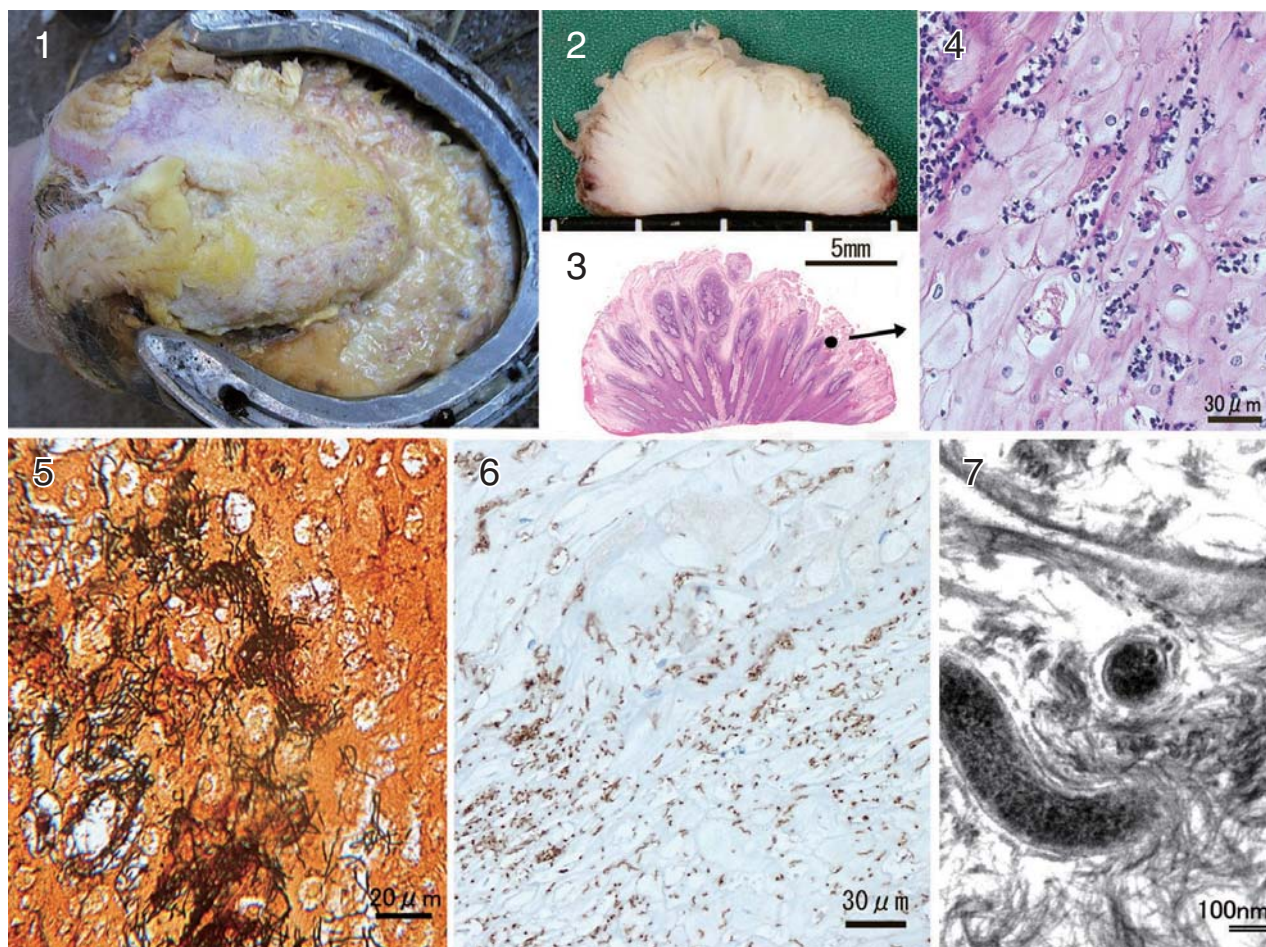
東北・関東地域の太平洋沿岸では、以前から大きな津波を伴う地震がいくつかの資料に記録されているらしい。そのうち今回の大震災に匹敵する規模は、菅原道真の時代に遡る869年に発生した貞観地震で、太平洋海底のプレート境界から発生した巨大地震と言われている。その後1611年、1896年および1933年の三陸地震津波、1960年にはチリ地震による津波が東北や関東地域の太平洋岸を襲っている（寒川旭著「日本人はどんな大地震を経験してきたのか」）。歴史をたどれば類似規模の巨大地震が資料に残されており、今回の大震災は想定外とはとても言い難い。また、1611年の大津波の際、津波が到達した地として後世に警告するために建立されたと言い伝えられる神社（波分神社）が仙台市内に現存しているそうであるが、月日と共に伝承は失われその由来を知らない地域住民も多いと言う。地震や津波の発生を予測し、減災に繋げようとする地震予知研究が国策として進められているが、これまで公的に地震の直前予知情報が出されたことはなく、海外でも予知に成功した事例はほとんどないと言う（東京大学出版会「地震予知の科学」）。地震の原因は地盤の動きによる歪みが解消される過程とされているが、発生するタイムスケールは人の寿命に比べてはるかに長く地理的なスケールも非常に大きいため、いずれ起こるにしても、この地殻変動が具体的に「いつどこで、どの程度に」を、一定の確率や幅を持たせて予測すること可能であっても理論的に予知することが困難であることは自明の理である。現在、観測データを参考にしたシミュレーション手法の研究が進められているらしいが、冒頭の首都直下地震の確率論も過去の履歴がもとになっている。以前大々的に予告された東海地震ではあったが、現実には阪神・淡路大震災と東日本大震災が続発した。

大震災後既に1年が経過しているが、復興や未来がさまざまに語られてはいるものの、被災地での進展は人々の懸命な努力にも関わらず遅々とし捗っていないようである。震災に追い討ちをかけられて日本経済・社会が混迷する中、変化に適応しながら生き抜くためのすべは一人の発想のみでつくれるものではなく、価値観の異なる多くの知恵を集めなければならない。知恵を出し合う仕組みを構築するには顔と顔を合わせながらコミュニケーションする場と風土の醸成が必要であり、知恵を擦り合わせる中で答えが生み出されれば、新たな展望が開けてくる。大地震や津波はこれまで繰り返し起きているが、先人たちは震災により命や財産を失い、日々の生活を破壊されながらもそれらを克服し今日の繁栄を築き上げてきた。時代や状況が変化した時、もともとあった理念や発想のどこを変えるべきかを研究することが重要な気がする。自国の歴史と文化を踏まえた上で理念の有効性を再検証し、その時々合った発想を実践に移していくことこそ、先人の知恵や歴史を現在に生かすことに繋がる。もう一度現場に立ち返り、変化を見据えてその場に適した再構築を目指していく必要があり、これは我々の身近なところにも当てはまるように思う。

(所長)

馬の蹄叉

JRA 総研 (日競研) 第 50 回獣医病理学研修会標本 NO. 1021



動物：馬，サラブレッド，雄，3歳（競走馬）

臨床事項：初診，左後蹄の蹄叉にイチゴ大の潰瘍と肉芽形成を認め，その後，異臭を放つカスタードクリーム状の白色軟性な角質の増生が進行した。抗生剤，収斂剤，消毒剤の病変部への塗布は全く効果がなく，8ヵ月後（図1）に全身麻酔下にて病変部を全摘出した。

肉眼所見：蹄叉の前額断面では，全体に白色充実性で，乳頭状の真皮組織が放射状に展開し，表皮組織も真皮に相対するように不完全な乳頭構造を形成していた（図2）。

組織所見：両染色で未角化な表皮細胞および染色抵抗性で明るい膨化した多角形から不整形の不全角化細胞の増生であった（図3）。不全角化細胞の一部は空胞化し，空胞内や近隣の角化細胞間に好中球を主体とした単核細胞が浸潤していた（図4）。一方，真皮にも形質細胞やリンパ球を主体とした単核細胞浸潤が認められた。ワルチンスターリー染色では，黒染した多数の螺旋菌が主に不全角化細胞域に一致して増殖していた（図5）。抗 *Treponema pallidum* ポリクローナル抗体による免疫染色では，この螺旋菌存在部位と一致して短桿状から螺旋状の陽性所見が得られた（図6）。また，表皮内浸潤した好中球は同抗体に陽性を示した。TEM 所見では，*Treponema* 属の超微形態学的特徴と合致する，太さ約 100～200nm，2～8本の軸系をもつ電子密度の高い螺旋菌が角質細胞間および細胞内に確認された（図7）。さらに，*Treponema* 属特異的な 16SrRNA 遺伝子をター

ゲットとしたタッチダウン PCR では，蹄底および蹄叉の病変から，陽性対照である牛趾皮膚炎由来 *Treponema* -16SrRNA 遺伝子と同サイズ（約 200bp）に陽性シグナルが得られた。

診断：トレポネマ属の感染が認められた馬の慢性増殖性蹄皮炎（いわゆる蹄癌）。

考察：慢性化を辿り，蹄角質の軟化，蹄表皮組織の乳頭状増殖，真皮炎が認められた本症の疾患名は蹄癌である。蹄癌は，近年，その臨床経過と病変が牛趾皮膚炎と酷似していること，病変部に複数種の *Treponema* 属が感染していること，それらの数種は牛と馬の双方の病変で分子生物学的に同種であることから発生機序を共有していると推察されている。一方，本症の病理組織学的診断名は，極めて古くは悪性蹄叉腐爛顆粒性慢性生角膜炎が，近年では増殖性蹄底・蹄叉炎が報告されている。しかし，部位を特定した診断名では，発生場所が蹄底や蹄叉だけではない本症の普遍的な診断名にならない。そこで今回，蹄に造詣の深い装蹄学でもっぱら用いられている蹄皮炎を診断名とした。蹄皮とは，蹄角質から蹄真皮までを総じて指す用語であり，英語の pododerm に非常に近い意味をもつ。

参考文献：

1. Nagamine, C.M. et al., 2005. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17: 269-271.
2. Moe, K. K. et al., 2010. *J. Vet. Med, Sci.* 72: 235-239.

牛ウイルス性下痢ウイルス非構造蛋白質と 宿主細胞因子との相互作用

明石博臣 (東京大学大学院農学生命科学研究科獣医微生物学研究室)

はじめに

宿主のウイルスに対する防衛機構として、インターフェロン (IFN) 産生を含む自然免疫は昔から知られていたが、その経路についての知見が集積してきたのはつい最近である。また、自然免疫は IFN 産生のみではなく、アポトーシス経路など、自身の生存・維持のための細胞内ネットワークと不可分であることも明らかとなってきた。しかし、個々のウイルスに対する宿主の反応はそれぞれ異なっており、そのことがウイルス毎に病態が異なる理由にもなっている。言い換えれば、病態の複雑なウイルスほど、宿主-寄生体関係が複雑であるとも考えられる。

フラビウイルス科ペスチウイルス属には、2種の牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) を含めて現在4つのウイルス種が分類されているが、いずれも動物の病原として非常に重要なウイルスである。このうち、豚コレラウイルスによって起こる豚コレラは、日本では家畜 (法定) 伝染病に指定され、国際獣疫事務局 (OIE) のリスト疾病でもある。また、ボーダー病ウイルスによって起こるボーダー病は、わが国では報告がないものの、めん山羊に呼吸器症状、下痢、流死産、先天性異常子の出産を引き起こし、欧米やオーストラリア、ニュージーランドなどの羊飼育地域では経済的に大きな問題となっている。これらのウイルスに共通の特徴として、細胞病原性 (cp) および非細胞病原性 (ncp) と生物学的性質の異なった2種類のウイルス株が存在することが知られている。中でも BVDV は、ncp 型 (ncp BVDV) から cp 型 (cp BVDV) への変換について、遺伝子性状に関する多くの研究がなされている。また、BVDV 感染牛の病態も大変ユニークである。ncp BVDV は野外において牛の間で流行を繰り返しており、軽い呼吸器症状や発熱を示す他、妊娠牛では胎子感染を起こし、流産や奇形子牛の出産などを示すと共に、感染時期によっては胎子に免疫寛容

(PI) を引き起こす。分娩された PI 牛は、その後粘膜部からの出血を主徴とする粘膜病を発症し、発症牛はほぼ 100% 死亡する。粘膜病発症牛から ncp および cp の両生物型のウイルスが分離されることから、ncp 型が cp 型に変異することにより発病すると考えられている [1]。

さらに、1980 年代後半に北米で、ncp BVDV による血小板の減少および消化管全体の出血性病変を伴う致死率の高い疾病、重症急性 (severe acute; SA) BVDV 感染症の流行が報告された [2]。このウイルスは既知の BVDV とゲノム塩基配列および抗原性が異なっており、既知のウイルスを BVDV 1、重症急性 BVDV を BVDV 2 として分類することとなった [3]。その後の研究により、BVDV 2 感染症は重症急性症状のみでなく、従来の BVDV 感染症と同様の病態を示すことも明らかとなった。

この様に、ウイルスの性質と宿主に及ぼす影響について見た場合、BVDV ほど複雑なウイルスは稀である。BVDV の宿主・寄生体関係を解き明かすことが出来れば、他のウイルスが引き起こす疾病の解明に大きな助けとなるものと考えられる。本研究では、ウイルス蛋白のうちウイルス非構造蛋白 (NS) と宿主因子との関わりについて研究を進めた。

牛ウイルス性下痢ウイルス (Bovine viral diarrhea virus; BVDV)

BVDV は、フラビウイルス科のペスチウイルス属に分類されるが、フラビウイルス科には節足動物によって媒介されるアルボウイルスを多く含むフラビウイルス属とヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) が唯一のウイルス種であるヘパシウイルス属も共に所属している。ペスチウイルス属とヘパシウイルス属はゲノム構造が類似しており、培養系が知られていなかった HCV のモデルウイルスとして BVDV が使われていたこともある。

ウイルスは約 12,300 の塩基からなるプラス 1 本

鎖 RNA をゲノムに持つ、中型の球形ないし不定形の粒子形態を示す。ゲノム RNA 鎖の 5' 末端には cap 構造を持たず、5' 末端側の非翻訳領域に存在する type III internal ribosome entry site (IRES) を介してリボソームに結合する。ウイルス蛋白は単一の読み取り枠 (open reading frame : ORF) からポリ蛋白として翻訳され、細胞およびウイルス由来の蛋白分解酵素によって、少なくとも 12 の成熟蛋白に開裂される。それぞれの蛋白は、N 末端側から N^{pro}, C, E^{ns}, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B と名づけられている [3]。N^{pro} は auto-protease 活性を持ち、カプシド蛋白である C と自身の C 末端の間を開裂させる [4]。C に続いて 3 種のエンベロップ糖蛋白 (E^{ns}, E1, E2) がコードされている。E^{ns} は RNase 活性を持ち、ウイルス構造蛋白ではあるが、単独で細胞外に分泌もされる [5, 6]。E1 は E2 と heterodimer を形成する。E^{ns} と E2 は homodimer を形成していることが知られており、両蛋白ともウイルスの細胞への吸着を阻害するところから中和抗原として機能するが、receptor である CD46 への結合には主として E2 が関与すると考えられている。P7 のウイルス複製における機能は不明であるが、イオンチャネルを形成するところから粒子組立に働いていると推測されている。

NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B はウイルス粒子には取り込まれない NS である。NS2-3 は ncp BVDV では非開裂であるが、cp BVDV では NS2 と NS3 に開裂する。NS2 は潜在的に protease 活性を持つが、通常は非活性であると考えられている。NS3 は N 末側に serine protease 活性と C 末側に helicase および NTPase 活性を持つ。NS4A は NS3 の serine protease cofactor として働く。NS4B の機能は良く分かっていないが、膜内在性蛋白であり、ウイルスゲノムの複製場所である膜様構造物の形成に関与していると考えられている。NS5A の機能として複製複合体の構成要素の一つである他は、現在のところ知られていない。NS5B は RNA dependent RNA polymerase 活性を有し、複製複合体の主要構成要素である [7]。

ウイルスは自然免疫に対抗する蛋白を保有し、感染細胞内において宿主の防衛反応から逃れていることが、最近多くのウイルスで明らかとなってきた。BVDV では、E^{ns} が 2 本鎖 RNA を分解することに

より、Toll like receptor 3 (TLR 3) 経路の活性化阻害を行っていることが報告されている。また、N^{pro} は IRF3 と結合することにより、ユビキチンリガーゼである TRIM56 を介してプロテアソーム依存的に IRF3 を分解することで、タイプ I IFN 応答を阻害することが知られている。

牛ウイルス性下痢ウイルス感染症

図 1 に示すように、BVDV では野外において初感染時に分離されるウイルスは全て ncp 型である。ncp BVDV が初感染した場合、白血球減少症を伴ったウイルス血症を示し、しばしば 2 峰性の発熱を見る。臨床的な変化は軽度の呼吸器疾患および下痢であり、時に不顕性に経過するが、ウイルスには免疫抑制作用があるため混合感染による多様な病型を示す場合がある。抗体陰性の妊娠牛に感染した場合、ウイルスが胎盤を通過し胎子感染を起こす。妊娠 120 日以降の感染では、流産や小脳形成不全を伴う奇形が認められる場合があるが、60 日から 120 日の妊娠初期における感染の場合、免疫寛容を示す PI 子牛の出産につながる。PI 牛はしばしば発育不良を示し、他種微生物の重感染による事故率も高いが、外見正常のまま生残する場合もある。PI 牛はウイルスに対する抗体を産生しないため、常に環境中にウイルスを排泄し、周囲の非感染牛に対する感染源として重要視される。さらに、PI 牛は粘膜部分からの出血を主徴とし、致死率の高い粘膜病を発症することが知られている。粘膜病発症牛から、持続感染している ncp BVDV と同一の血清型を示す cp BVDV が分離されるところから、体内に存在する ncp 型ウイルスが cp 型に変異することにより発症すると考えられている。

1980 年代後半から 1990 年代前半にかけて、北米において激しい血小板減少と出血性病変を伴い、致死性の高い子牛の SA BVDV 感染症が流行した。ウイルスは ncp 型の性状を示し、BVDV 1 と抗原性や遺伝学的性状が異なるため新しいウイルス種であるとされ、BVDV 2 と名づけられた。その後、BVDV 2 の一部のウイルスのみが SA BVDV 感染症を起こすことから、SA BVDV 2 と呼ばれるようになった [8]。大多数の BVDV 2 は BVDV 1 と類似した病態を示す。日本では BVDV 2 の存在が知られていな

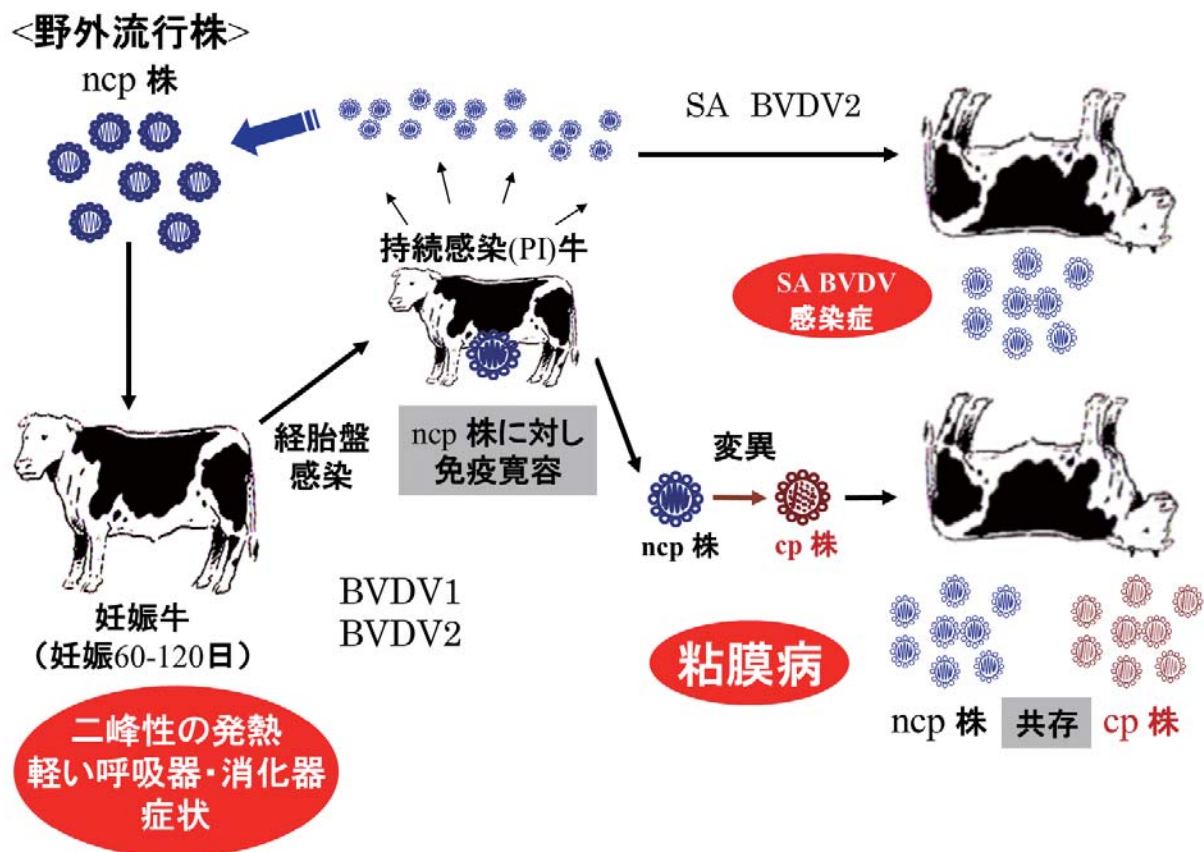


図1 主要な BVDV 感染経路と病気, SAREC

かったが、佐藤らは栃木県の粘膜病発症牛から分離された ncp および cp BVDV が、従来の BVDV 1 と抗原性が異なることを報告した。Nagai らは 5' 末端非翻訳領域の塩基配列の分子系統樹解析から、これらのウイルスが BVDV 2 に分類されることを明らかとし、北米での流行とほぼ同時期に既に日本に侵入していたことを報告している [9]。

BVDV の細胞病原性

Shimizu らは、PI 牛に持続感染していた BVDV 1 (KS86-1ncp) と抗原性状が異なる BVDV 1 (Nose) を実験的に重感染したところ粘膜病を発症し、KS86-1ncp と抗原性状を同じくする cp BVDV (KS86-1cp) が分離されたことを報告している [10]。その後 Nagai らは、この 3 株の全塩基配列を決定し、KS86-1cp が KS86-1ncp と Nose のキメラウイルスであることを明らかとした。また、Nose の 5' 末端側コード領域には N^{pro} コード領域と C コード領域の一部が重複していること、宿主由来の Jiv 遺伝子が挿入されていることを見出し、Nose の細胞病原性には Jiv が関与していること、およびこの領域

が KS86-1ncp ゲノムに組み込まれることで KS86-1cp が生じたことを考察している [11] (図 2)。粘膜病を発症した PI 牛から分離される cp BVDV の出現メカニズムについて、① NS2-3 開裂部位に ubiquitin などの宿主遺伝子が挿入される。② NS2 領域におけるポイントミューテーションにより NS2 の cysteine protease が活性化する。③ 宿主遺伝子および NS3 領域が重複して挿入される。④ NS2 領域に宿主遺伝子が挿入される。⑤ N^{pro} から NS3 領域の欠損変異体の重感染が認められるなどが報告されていた [12]。この結果 NS3 が感染細胞内で産生されることにより各 NS の開裂が効率よく

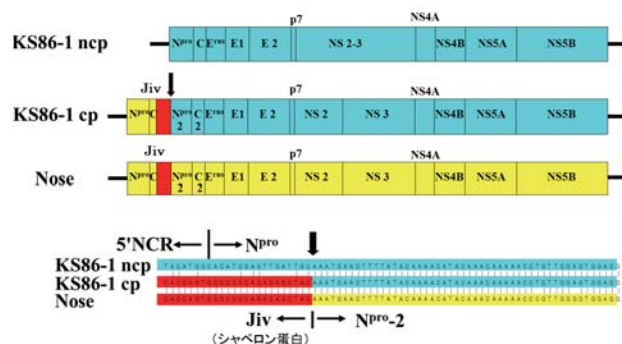


図2 KS86-1cp 株のゲノム構造

行われ、複製複合体の産生量の増加からゲノム複製が増加することが cp BVDV の出現につながると考えられている。しかし、ゲノムの複製が増加することが、なぜ cp BVDV の出現につながるかについては明確な説明がなかった。

一方、cp BVDV はマクロファージや感染培養細胞において IFN 応答を誘導するが、ncp BVDV は IFN 誘導能を欠くことが知られている。また、BVDV 感染細胞では合成 2 本鎖 RNA による抗ウイルス作用が抑制されること、マクロファージにおいても BVDV が 2 本鎖 RNA によって誘導される IFN 応答を阻害することが報告されている。これに対し、牛胎子において ncp BVDV 感染では IFN 応答が見られないのに対し、cp BVDV は IFN を強く誘導することが知られている。IFN 経路と細胞病原性に関わるアポトーシス経路は密接に関連しており、cp BVDV の強い IFN 誘導能がアポトーシスを引き起こす可能性について考察されてきた。

1. cp BVDV のアポトーシス経路

cp BVDV がアポトーシスを起こし、内因系経路や酸化ストレスが関与しているという報告があったが、その詳細な経路や何が引き金となるかについては不明であった。また、炎症性サイトカインであり、外因系アポトーシスを誘導することが知られている TNF- α が cp BVDV の CPE を増強するという報告もあり、cp BVDV のアポトーシス経路について検討を行った。

cp BVDV 感染細胞上清を紫外線照射により不活化し、ウイルス非感染細胞に添加したところアポトーシスを誘導したため、誘導因子の探索を行った。また、cp BVDV 感染細胞において 50 種以上のアポトーシス関連因子の発現について調査した。この結果、アポトーシスの誘導には TNF- α が関与していることが、相補鎖の導入や抗体による抑制試験から明らかとなった [13]。cp BVDV 感染細胞では、TNF- α 、Mx1、iNOS、PKR (2 本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ)、OAS-1 (オリゴアデニレートシンターゼ 1) の発現が上昇していた。これらの因子は 2 本鎖 RNA や IFN によって誘導されることが知られている。このため、感染細胞における 2 本鎖 RNA 量を測定したところ、cp BVDV 感染細胞では 2 本鎖 RNA 蓄積量が ncp BVDV 感染細胞の 100 倍程度存在した [14] (図 3)。

PKR や OAS-1 は IFN によって誘導され、2 本鎖 RNA を検知することにより、ウイルス核酸の分解や蛋白の翻訳阻害を起こすことが知られている。また、これらの因子はアポトーシスの誘導に関連することが報告されている。このため、cp BVDV 感染細胞において PKR と OAS-1 を RNAi によってノックダウンしたところ、両者を阻害した場合に CPE の発現が抑制された (図 4)。これらの結果から、cp BVDV の細胞病原性には、内因性経路の他に外因性経路が関与しており、2 本鎖 RNA の蓄積による PKR と OAS-1 の誘導が大きな役割を果たしていることが明らかとなった [13]。

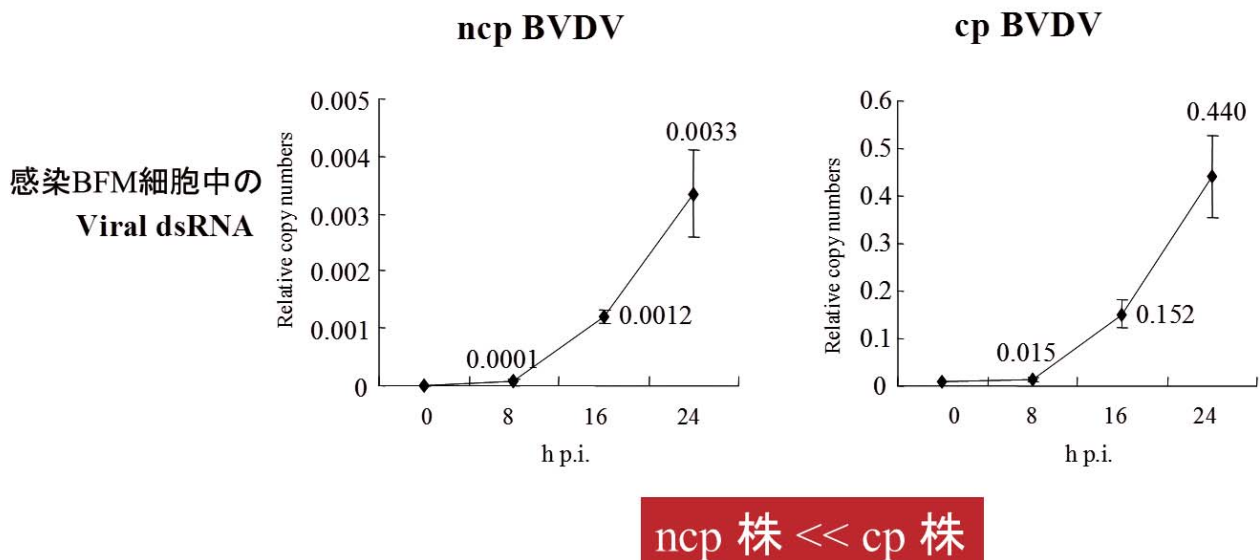


図 3 細胞内ウイルス 2 本鎖 RNA 量の比較

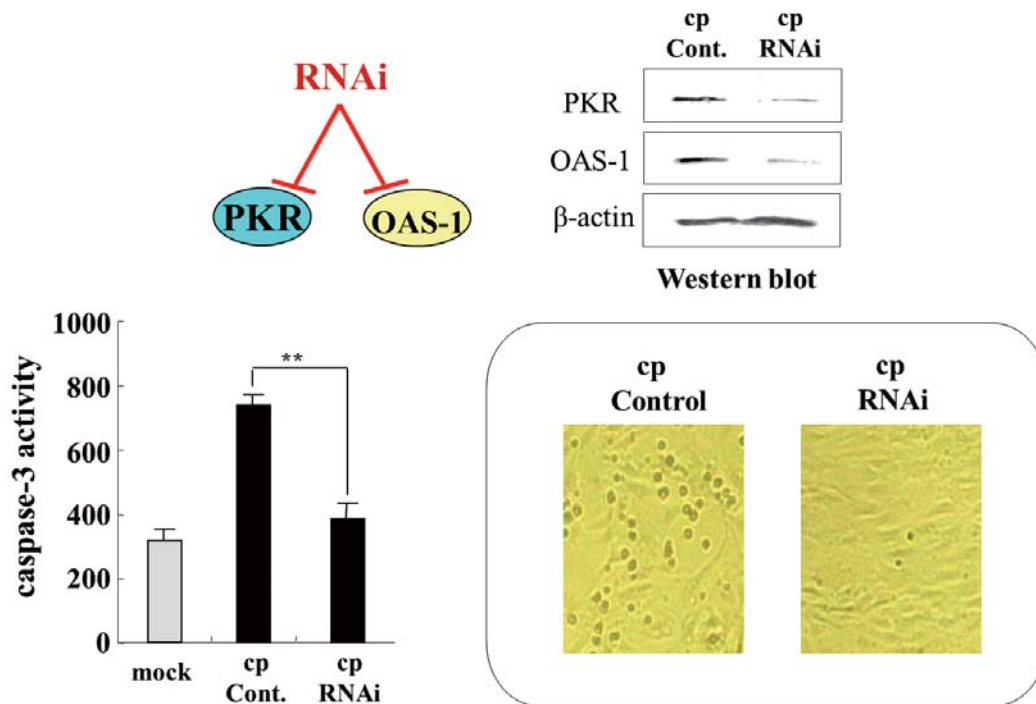


図4 cp BVDV 感染細胞における PKR および OAS-1 遺伝子の RNAi による抑制試験

BVDV の病態形成，特に粘膜病について，ncp と cp BVDV の共存が必須であることは既に述べた。*in vitro* で得られた知見と *in vivo* における病態形成の関連性を検討するため，PI 牛脾臓中のウイルス 2 本鎖 RNA 量と IFN およびアポトーシス関連因子の発現状況について検討した。その結果，2 本鎖 RNA 蓄積量と自然免疫関連因子発現量との間に正の相関が認められた。また，RNA 量の高い個体ではプレ粘膜病と考えられる病態が顕著であったところから，*in vivo* においてもウイルス RNA 複製量が宿主の自然免疫誘導や病態形成に重要であることが示唆された [15]。

2. BVDV 感染細胞のマイクロアレイ解析

栃木県の齋藤らは，ncp BVDV が CPE を示す MDBK-SY 細胞を報告している。もし，従来の MDBK 細胞と MDBK-SY 細胞のアポトーシス経路を比較できれば，ncp BVDV の非細胞病原性について解答が得られる可能性がある。このため，ncp BVDV 感染時の両細胞における自然免疫関連因子の動態について検討したが，差が認められなかったため，MDBK 細胞と BFM 細胞を用いて cp および ncp BVDV 感染時のマイクロアレイ解析を行った。

その結果，ncp BVDV では両細胞とも感染前後で

顕著な遺伝子発現状況の差が認められなかったのに対し，cp BVDV は MDBK 細胞と BFM 細胞に等しくアポトーシスを誘導するものの，遺伝子発現パターンは両細胞間で大きく異なっていた (図 5)。線維芽細胞である BFM 細胞では，主に IFN 誘導に関連する因子や炎症性サイトカイン遺伝子の上昇が認められたのに対し，上皮系の特徴を持つ MDBK 細胞では小胞体ストレス関連因子遺伝子の上昇が顕著であったが，IFN 応答経路の因子は低いレベルの応答を示したのみであった。その他の因子群についても両細胞間において異なる発現パターンが見られ，細胞によって異なる機序で細胞病原性が誘導されることが明らかとなった [16]。

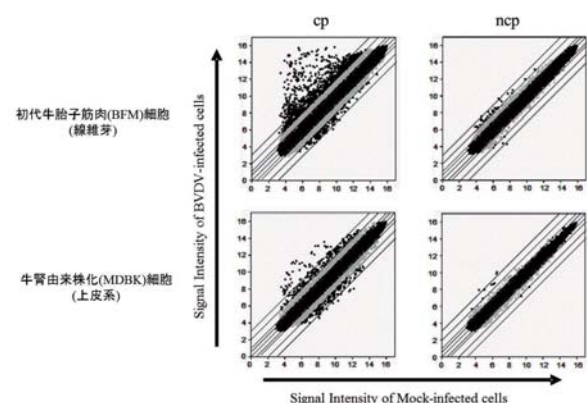


図5 マイクロアレイを用いた網羅的 mRNA 発現解析

ウイルス蛋白と宿主細胞因子との相互作用

インフルエンザウイルスの NS1 やパラミクソウイルスの V など、抗 IFN 活性を示す蛋白が知られている。ウイルス感染初期において IFN 応答は大きな役割を果たすため、ウイルスは抗 IFN 活性を示す蛋白を持つ必要がある。BVDV でも、N^{pro} や E^{ms} には IFN 応答を阻害する作用が知られている。さらに、ウイルスは複製のために細胞の機能を借りる必要があるところから、ウイルス蛋白は IFN 経路のみでなく、様々な細胞内ネットワークの因子と相互作用を行っている。しかし、BVDV では NS の本来の機能すら詳細に検討されているとは言い難い。従って、BVDV NS と宿主因子の相互作用の解明は、病原性解析のため是非とも明らかにせねばならない研究テーマである。

1. NS3 と宿主因子の相互作用

ウイルス蛋白と宿主因子の相互作用を解析する方法はいくつかあるが、イースト 2 ハイブリッド法は宿主側因子を網羅的に調べることが出来るため良く用いられる。探索するウイルス側蛋白をベイトと呼ぶが、NS3 の N 末側 142 アミノ酸領域をベイトとして MDBK 細胞の cDNA ライブラリーから結合パートナーを探索した。その結果、スフィンゴシンキナーゼ (SphK) 1 の C 末側 164 アミノ酸をコードする cDNA が同定された。スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、スフィンゴ脂質で生体膜の構成成分であるが、酵素切断により膜から遊離し、様々な生物学的活性を有する生理活性物質でもある。その作用は細胞の増殖や生存に関与していることが知られている。SphK はスフィンゴシンをリン酸化することで S1P を産生する働きを持つ。これに対し、セラミドはスフィンゴシンと脂肪酸鎖が重合した分子であり、細胞の成長停止や細胞死に深く関与することが知られている。従って、SphK はスフィンゴシンから S1P を産生することにより、細胞の生死を生存側に傾ける重要な因子である。

組換え NS3 および NS2-3 と組換え SphK1 を牛由来細胞に強制発現させ、免疫沈降法によって両者の結合を見たところ、結合が確認された。また、ウイルス感染細胞に SphK1 を過剰発現させても同様の結果が得られた。共焦点顕微鏡観察では両者は小

胞体膜上に共局在していた。さらに、NS3 は SphK1 のキナーゼ活性を *in vitro* および *in vivo* において濃度依存的に抑制した。ウイルス感染細胞において、siRNA による SphK1 ノックダウンやドミナントネガティブ変異体による SphK1 発現抑制を行ったところ、ウイルス RNA の複製増強が認められた。これらの結果から、BVDV は NS3 または NS2-3 の SphK1 抑制作用によってスフィンゴシンおよびセラミドの蓄積を誘導し、脂質ラフト依存的なウイルス複製を増幅している可能性が示唆された [17] (図 6)。

2. NS5A と宿主因子の相互作用

HCV の NS5A は RNA 複製複合体の一部であり、NS5B と結合することによって RNA polymerase 活性を阻害し、ゲノム複製を調節していると報告されている。また、宿主細胞の IFN 応答因子と相互作用し、自然免疫系阻害に働くことも知られている。さらに、NS5A の過剰発現により、細胞の様々なシグナル経路が活性化されることも報告されるなど、多様な機能を担う蛋白である。これに対し、BVDV の NS5A は 56-58 kDa のリン酸化された亜鉛結合性蛋白で、HCV NS5A との構造上の類似性から機能的にも類似していることが推測されているが、BVDV NS5A に関する知見は少ない。

BVDV の病原性発現における NS5A の機能を知る目的で、NS3 と同様の手法を用い細胞側の結合パートナーを探索することとした。NS3 では市販の抗体が利用可能であったが、NS5A に対する特異的抗体は無かったため、モノクローナル抗体 (MAb) を作成した。2 種の MAb が得られ、両抗体とも

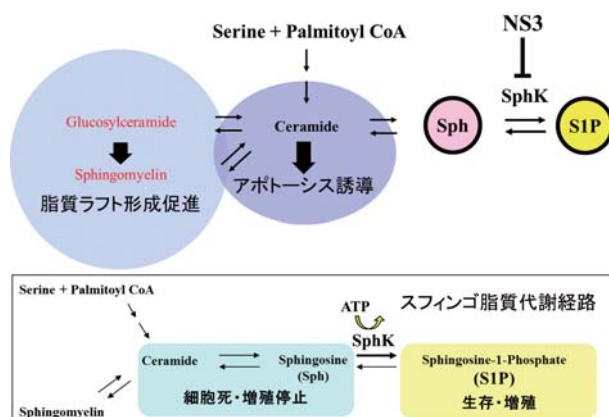


図 6 NS3 によるスフィンゴ脂質代謝制御

NS5AのN末端領域を認識していた。このうち、MAb 1H12はBVDV 1およびBVDV 2を共に検出することに成功した。この抗体を用いた共焦点レーザー顕微鏡観察では、NS5AはNS3と共に感染細胞の小胞体膜に局在した[18]。

NS5Aと結合する宿主因子の探索では、NS5AのN末側領域をベイトとしたスクリーニングを行った結果、MDBK細胞のcDNAライブラリーからNIBP (NIK and IK- β binding protein) と呼ばれる因子を同定することが出来た。NIBPはNIK (NF- κ B inducing kinase) およびIKK複合体中の β と結合し、NF- κ Bの転写活性を増強することが報告されている。我々はNIBPとNS5Aが小胞体で共局在することを確認し、プルダウン法によって両者の結合を確認した。さらに、種々のNIBP欠損変異体を作成し、NS5Aとの結合部位を探索したところ、NIBPアミノ酸配列の597から623残基がNS5Aとの結合に関与していることを明らかとした。また、NS5Aを細胞内で過剰発現させた場合、TNF- α によるNF- κ Bの活性化が阻害され、さらにウイルス感染細胞においてNIBP遺伝子をsiRNAによって抑制した結果、ウイルス増殖が上昇した。これらの成績から、NS5Aが細胞因子のNIBPと結合することにより、NF- κ Bの転写活性を抑制し、ウイルスの増殖を有利に進めていることが示唆された[19] (図7)。

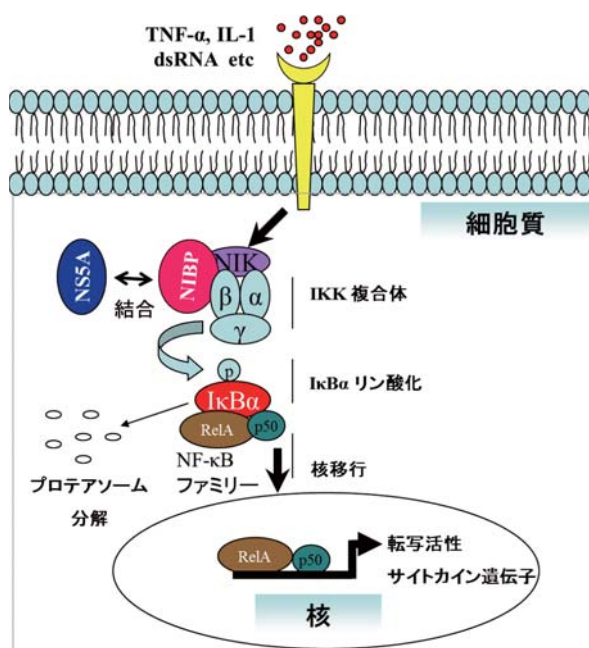


図7 NS5AとNIBPの結合によるNF- κ B転写活性の増強阻止

3. NS4Aと宿主因子の相互作用

BVDVのNS4Aは64アミノ酸よりなる分子量7kDaの蛋白であり、HCV NS4Aとサイズ、アミノ酸組成、疎水性などが類似している。HCV NS4Aは様々な宿主細胞シグナル伝達経路と相互作用することが知られているが、BVDV NS4Aの詳細な機能や宿主因子との相互作用については全く知られていない。このため、NS4Aの結合パートナーを探索した結果、3種の細胞因子が同定された(論文準備中)。そのうちの2種はtype I IFN誘導に関わる因子で、NS4Aとの結合によりIFN産生抑制が認められた。もう1種の宿主因子はRNA editingに関与し、種々のウイルスで抗ウイルス活性を示すことが報告されている。NS4Aはこの分子のRNA結合モチーフと競合的に結合し、抗ウイルス作用を無効化する役割を果たしていることが示唆されている。この様に、BVDV NS4Aは他のNSと同様、ウイルスと宿主細胞因子との相互作用において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

おわりに

ウイルスの病原性発現機構を明らかとすることは、ウイルス学を志すものにとって永遠の命題である。ウイルス学者はウイルス側の能力を探ることで病気を理解しようとしてきたが、宿主との相互作用が明らかとならない限りは、発病機構を理解することは不可能である事も良く知られた事実である。細胞内シグナル伝達系は現在でも完全に解き明かされたとは言い難く、このことがウイルスの宿主体内はもちろん、培養細胞内における増殖と、ひいては病原性発現の解析を難しくしている。ウイルスの構造、非構造蛋白と宿主因子の相互作用を理解することは、ウイルスの病原性を明らかとすることにつながるばかりでなく、宿主因子の機能解析にも大きな助けとなる。また、ウイルスの制御をウイルス側因子ではなく、細胞側因子に影響を与えることで成し遂げる可能性にもつながることが期待される。我々はBVDVのNS中少数のものについて宿主因子との反応を明らかにしたに過ぎず、BVDVの病原性発現機構の全体像を描くにはほど遠いのが現状である(図8)。しかし、BVDVを含めてウイルス因子と細胞因子との相互作用解析研究は始まったばかりであり、

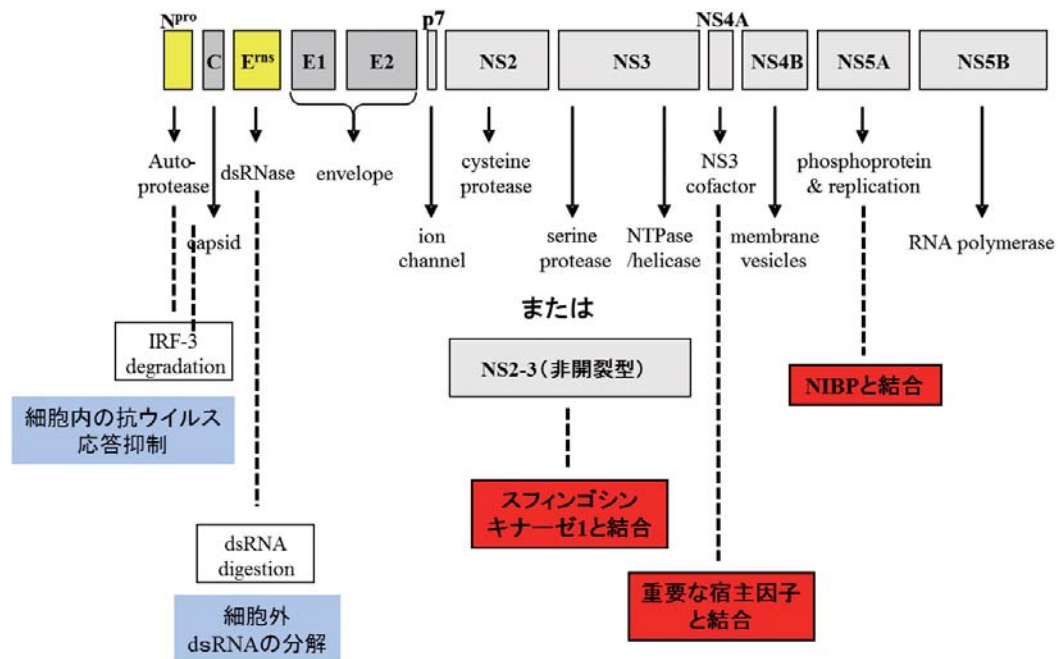


図8 BVDV ゲノム構造と各種ウイルス蛋白の機能

今後大きな成果が期待出来る分野である。若い研究者が従来の考え方にとられることなく、独自の手法、独自の考え方で大きな成果を上げることが期待している。

参考文献

- Peterhans, E., Bachofen, C., Stalder, H. and Schweizer, M., 2010. Cytopathic bovine viral diarrhea viruses (BVDV) : emerging pestiviruses doomed to extinction. *Vet. Res.* **41** : 44. Doi : 10.1051/vetres/2010016.
- Corapi, W. V., Elliot, R. D., French, T.W., Arthur, D. G., Bezek, D. M. and Dubovi, E. J., 1990. Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196** : 590-596.
- Thiel, H. J., Collet, M. S., Could, E. A., Heinz, F. X., Houghton, M., Meyers, G., Purcell, R. H. and Rice, C.M. 2005. Family Flaviviridae. In *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.* Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (Eds), Elsevier Academic Press, San Diego.
- Wiskerchen, M., Belzer, S. K. and Collett, M. S. 1991. Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* **65** : 4508-4514.
- Rumenapf, T., Unger, G., Strauss, J. H. and Thiel, H. J. 1993. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* **67** : 3288-3294.
- Schneider, R., Unger, G., Stark, R., Schneider - Scherzer, E. and Thiel, H-J. 1993. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science.* **261** : 1169-1171.
- Yamane, D. and Akashi, H. 2010. Interaction between bovine viral diarrhea virus proteins and host cell factors. *Current Topics in Virology.* **8** : 63-69. Research Trends, T.C., India.
- Pellerin, C., van den Hurk, J., Lecomte J. and Tijsen, P. 1994. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology.* **203** : 260-268.
- Nagai, M., Sato, M., Nagano, H., Pang, H., Kong, X., Murakami, T., Ozawa, T. and Akashi, H. 1998. Nucleotide sequence homology to bovine viral diarrhea virus 2 (BVDV 2) in the 5' untranslated region of BVDVs from cattle with mucosal disease or persistent infection in Japan. *Vet. Microbiol.* **60** : 271-276.

10. Shimizu, M., Satou, K., Nishioka, N., Yoshino, T., Momotani, E. and Ishikawa, Y. 1989. Serological characterization of viruses isolated from experimental mucosal disease. *Vet. Microbiol.* **19** : 13–21.
11. Nagai, M., Sakoda, Y., Mori, M., Hayashi, M., Kida, H. and Akashi, H. 2003. Insertion of cellular sequence and RNA recombination in the structural protein coding region of cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* **84** : 447–452.
12. Kummerer, B. M., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H-J. and Meyers, G. 2000. The genetic basis for cytopathogenicity of pestiviruses. *Vet. Microbiol.* **77** : 117–128.
13. Yamane, D., Nagai, M., Ogawa, Y., Tohya, Y. and Akashi, H. 2005. Enhancement of apoptosis via an extrinsic factor, TNF- α , in cells infected with cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Microbes Infect.* **7** : 1482–1491.
14. Yamane, D., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H. 2006. The double-stranded RNA-induced apoptosis pathway is involved in the cytopathogenicity of cytopathogenic Bovine viral diarrhoea virus. *J. Gen. Virol.* **87** : 2961–2970.
15. Yamane, D., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H. 2008. The relationship between the viral RNA level and upregulation of innate immunity in spleen of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* **129** : 69–79.
16. Yamane, D., Zahoor, M.A., Mohamed, Y.M., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H. 2009. Microarray analysis reveals distinct signaling pathways transcriptionally activated by infection with bovine viral diarrhoea virus in different cell types. *Virus Res.* **142** : 188–199.
17. Yamane, D., Zahoor, M. A., Mohamed, Y. M., Azab, W., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H. 2009. Inhibition of sphingosine kinase by Bovine viral diarrhoea virus NS3 is crucial for efficient viral replication and cytopathogenesis. *J. Biol. Chem.* **284** : 13648–13659.
18. Zahoor, M. A., Yamane, D., Mohamed, Y. M., Kobayashi, K., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H. 2009. Characterization and application of monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus nonstructural protein 5A. *Arch. Virol.* **154** : 1745–1754.
19. Zahoor, M. A., Yamane, D., Mohamed, Y. M., Suda, Y., Kobayashi, K., Kato, K., Tohya, Y. and Akashi, H. 2010. Bovine viral diarrhoea virus nonstructural protein 5A interacts with NIK and IKK β -binding protein (NIBP). *J. Gen. Virol.* **91** : 1939–1948.

レビュー

アピコンプレクス門原虫が産生する 植物ホルモン様物質とその作用

永宗喜三郎 (国立感染症研究所 寄生動物部)

1. アピコンプレクス門原虫の進化的位置

現在、真核生物は8つのスーパーグループに大別できるという説が広く受け入れられつつある(図1)。その中で哺乳動物や酵母はオピストコンタと呼ばれる単一のグループに分類されており、以前よく言わ

れていた「酵母からヒトまで広く保存されている」というフレーズは、今では真核生物の一つのスーパーグループを代表するという意味でしかなくなりつつある。また、これら8つのスーパーグループの中で、実に7つのスーパーグループにいわゆる「寄生物」が存在している点は、寄生物の進化を考

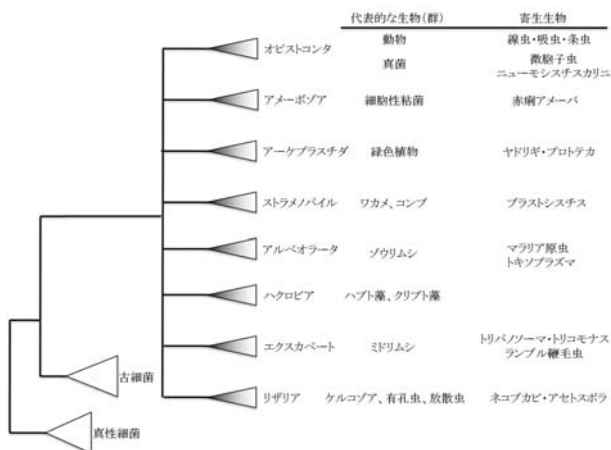


図1 真核生物の8つのスーパーグループ。各グループに属する代表的な生物と寄生物も示した。

える上で実に興味深い事実である。すなわち、寄生物は単一の祖先生物から分化したのではなく、様々に進化した生物がそれぞれの事情により「寄生」する道を選択したと考えられる。「寄生」という現象はそれほど魅力的なものなのか、多くの生物を寄生物への進化に突き動かしている要因は何か、非常に面白く興味をそそるテーマであるが、いまだその答えは得られていない。

さて、これらのスーパーグループの中で、著者が興味を持っている対象であるトキソプラズマやマラリア原虫が属しているアピコンプレクス門は、アルベオラータと呼ばれるスーパーグループに属している。アピコンプレクス門に属する原虫には現在5,000種以上が知られており、全てが寄生性の原生生物である [5]。この中にはマラリア原虫やトキソプラズマ、クリプトスポリジウムなど人類にとって大きな脅威となっている感染症の病原体や、バベシアやアイメリアなど獣医、畜産学領域で大きな問題になっている病原体が含まれている [6, 13]。

それでは次に、現在考えられているアピコンプレクス門原虫の進化の道筋を見てみよう (図2)。現在報告されている中でアピコンプレクス門原虫に最も近縁な生物はクロメラと呼ばれるサンゴに共生している藻類である [7]。クロメラは光合成能を有しているが寄生能力は持っていない。後述する通り、アピコンプレクス門原虫の祖先は光合成をしていたと考えられており、クロメラとアピコンプレクス門原虫の遺伝的近縁性はその傍証の一つとなっている。クロメラの祖先とアピコンプレクス門原虫の祖先が分岐したのは、およそ4億2千万年前のことであり、

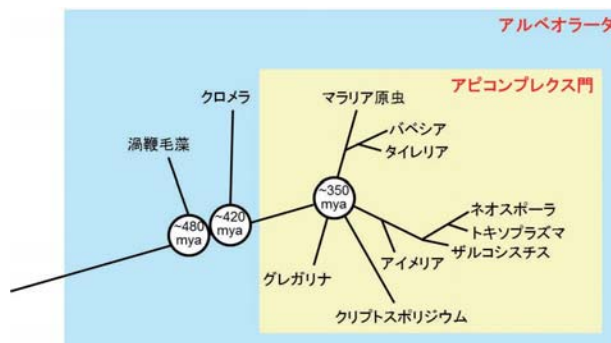


図2 アピコンプレクス門の進化。アピコンプレクス門に属する生物種は今からおよそ3億5千万年前以降にそれぞれ分化したと推定されている (Wellems *et al.* (2009) より改変) [12]。

その後今から約3億5千万年前以降に、現在のアピコンプレクス門原虫の種が分化、成立していったものと考えられている [12]。一方で鳥類の祖先が哺乳動物の祖先と分岐したのが約4億年前のことであると推定されていることと合わせて考えると [9]、アピコンプレクス門原虫間の進化的距離が想像しやすいであろう。

アピコンプレクス門に属する原虫の大きな特徴の一つとして、アピコプラストと呼ばれるオルガネラの存在が挙げられる。アピコプラストは葉緑体が退化してできた4重膜構造の細胞内小器官であり、通常の葉緑体は光合成細菌が植物の祖先に取り込まれて進化したものとされているが、アピコプラストは光合成細菌を取り込んだ紅藻類の祖先が原虫の祖先生物に取り込まれることによって成立したと考えられている [1] (図3)。そのために、アピコプラストは独特の四重膜構造をとる。現在ではアピコプラストは光合成能を失ったものの、脂肪酸合成などの機能を今でも担っており、したがって原虫にとって必

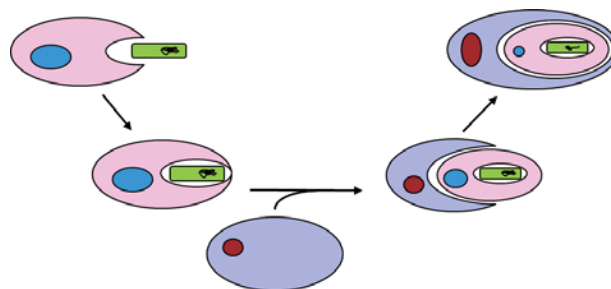


図3 アピコプラストの成立機序。通常の葉緑体は光合成細菌 (緑) が植物の祖先 (ピンク) に取り込まれて進化したものとされているが、アピコプラストは光合成細菌を取り込んだ紅藻類の祖先が原虫の祖先生物 (紫) に取り込まれることによって成立したと考えられている。

須のオルガネラである [10]。しかしながらその機能の詳細は不明であり、何故原虫の生存に必須なのかもはっきりとはわかっていない。いずれにしても、アピコンプレクス門原虫の細胞内には植物が「組み込まれている」ということは今やよく知られている事実となっている。

2. トキソプラズマ

アピコンプレクス門に属するトキソプラズマは、ほとんどの温血動物の全ての有核細胞に感染能を持ち、全人類の 1/3 以上、日本人の約 25 - 30% が感染していると言われている非常に広く蔓延している寄生性原生生物である [3]。多くの感染者にとってトキソプラズマ感染は不顕性に経過するが、一方でトキソプラズマ感染症は一度発症すると非常に重篤な感染症となる。1999 年アメリカ CDC からの報告の中では、トキソプラズマ症は、food borne disease による全入院患者のうち原因の明らかになったものの 4.1% (第 4 位)、死者数においては 20.7% (第 3 位) にもなると推定されている [6]。また、トキソプラズマ原虫は HIV 感染者に致死的な脳炎を引き起こして患者を死に至らしめることが知られており、アメリカでの統計によると HIV 感染患者の 18-25% がトキソプラズマ脳炎を発症することが報告されている [4]。一方 1999 年 WHO からの報告によると [13]、1998 年の全世界の総死者数の 25% を占める、感染症による死者のうち、17.3% が AIDS を原因として亡くなっている事と合わせて考えると、世界中の感染症による死者の約 4% はトキソプラズマ感染症が原因で亡くなっていると思積もることができる。

トキソプラズマが人に感染した場合、その増殖はタキゾイトとブラディゾイトという 2 つのステージに分けることができる (図 4)。タキゾイトは宿主細胞内に形成された小胞内で急速に増殖するステージで、宿主細胞内への侵入、分裂、宿主細胞からの脱出と次の宿主細胞への移動と付着を次々と繰り返し、感染を広げていく。一方、ブラディゾイト、あるいはシストと呼ばれるステージでの原虫の分裂は非常に緩慢で、シストは主に中枢神経系や筋肉系に存在している。シストとなった原虫は宿主の免疫応答から逃れ、宿主が免疫抑制状態になり再活性化で

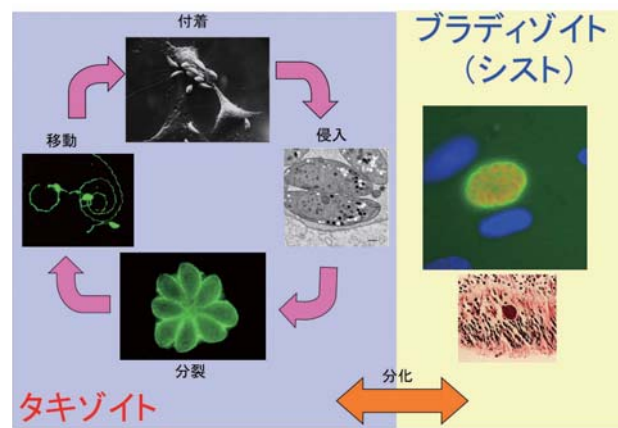


図 4 トキソプラズマの増殖サイクル。宿主に感染したトキソプラズマは最初タキゾイトとして活発に増殖する。その後、原虫は増殖をほとんど停止し、宿主からの免疫応答から逃れるため被嚢したブラディゾイト (シスト) へと分化し、再活性化の機会を待つ。

きるまで長期間生存する。再活性化した原虫は再びブラディゾイトとなり感染を再拡大し、宿主の組織を破壊する。

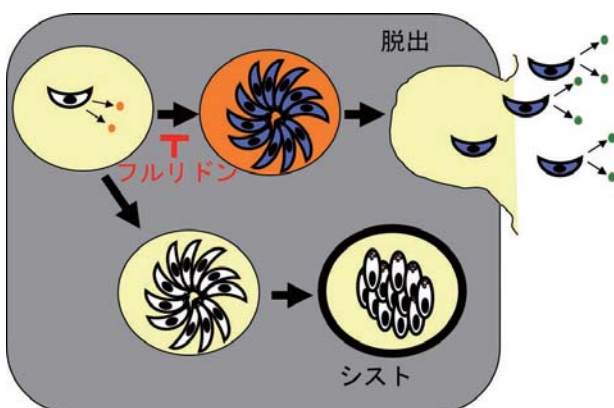
3. トキソプラズマと植物ホルモン

著者らは最近、トキソプラズマが植物ホルモンの一種であるアブシジン酸を産生し、原虫はこのホルモンにより自身の増殖を調節していることを見出した [8]。アブシジン酸は高等植物ではセカンドメッセンジャーである cyclic ADP-ribose (cADPR) の産生依存的に細胞質内へのカルシウム放出を引き起こすことが知られている。このアブシジン酸をトキソプラズマに添加すると、原虫の運動や宿主細胞への侵入に重要な役割を持つマイクロネームタンパク質の分泌が誘導された。著者らは既に、マイクロネームタンパク質の分泌は cADPR 依存的な原虫細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることを見出していたので [2]、実際にアブシジン酸添加後に原虫の産生する cADPR を測定したところ、加えたアブシジン酸量に依存して有意に上昇していた。また、このアブシジン酸によるマイクロネームタンパク質分泌は細胞質内カルシウム濃度の上昇に依存していることが確認できた。

更に我々は MS 解析により、トキソプラズマ原虫が実際にアブシジン酸を産生していることを証明した。また、宿主細胞内の原虫に外部からアブシジン酸を加えると、原虫の宿主細胞からの脱出が誘導さ

れた。更に、植物においてアブシジン酸生合成の特異的阻害剤であることが知られているフルリドンは、トキソプラズマにおいてもアブシジン酸生合成を阻害した。そこで原虫の培養をフルリドン処理すると、トキソプラズマは加えたフルリドンの濃度依存的に宿主細胞からの脱出が阻害された。またこの阻害は外部からのアブシジン酸添加によって相補できた。これらのことからアブシジン酸は原虫にとって、宿主細胞からの脱出のシグナルになっていると思われる。また、アブシジン酸生合成阻害剤フルリドンの培養中への添加によりアブシジン酸の生合成を阻害すると、原虫のシストへの分化が誘導された。以上の結果から、トキソプラズマ原虫はアブシジン酸を産生しており、アブシジン酸は原虫内でカルシウム放出のセカンドメッセンジャーである cADPR 産生を誘導し、細胞質内カルシウム濃度を上昇させ、宿主細胞からの脱出やそれに伴う運動と次の宿主細胞への侵入を促進する、また一方でアブシジン酸の濃度の減少は原虫のシストへの分化を誘導する、という一連のシグナルの存在が示唆された (図5)。

フルリドンは一方で、マウスを用いたトキソプラズマ感染実験において、マウスの致死率を有意に減少させた。フルリドンが哺乳動物に対し毒性が弱く、除草剤として用いられている事実と合わせて考えると、この結果は、フルリドン、あるいはアブシジン



- ABA
- Ca²⁺
- マイクロネームタンパク質

図5 トキソプラズマが産生する植物ホルモン、アブシジン酸の作用機序。アブシジン酸 (オレンジ) の蓄積が原虫細胞質内カルシウム (青) 濃度の上昇を引き起こし、原虫は宿主細胞からの脱出やマイクロネームタンパク質 (緑) の分泌を開始する。フルリドンはアブシジン酸の生合成を阻害し、原虫の脱出を抑制することによりシストへの分化を誘導する。

酸生合成阻害剤は抗トキソプラズマ薬開発のいいリード化合物となる可能性が示唆された。

4. おわりに

マラリア原虫やトキソプラズマを初めとする、多くのアピコンプレクス門原虫はアピコプラストと呼ばれる紅藻由来の共生器官を持っていることから、これらアピコンプレクス門原虫は葉緑体由来の多くの代謝経路を未だ保持している可能性が考えられている。事実、アピコンプレクス門原虫はイソプレノイドを合成するための経路 (メバロチン経路) を消失しており、そのためイソプレノイド合成は、植物と同じ DOXP-MEP 経路を持つアピコプラストに依存していることが知られている [11]。高等植物において、アブシジン酸の生合成の多くのステップは葉緑体内で行われていることと、アブシジン酸生合成はイソプレノイドからβ-カロチンを合成することから開始されることから、おそらくトキソプラズマにおいてもアブシジン酸生合成の大部分はアピコプラストにおいて行われている可能性が示唆できる。また、アピコンプレクス門原虫において既に光合成能を失ったアピコプラストが未だ原虫の生存に必須であるという理由の一つに、今回見出されたアブシジン酸生合成経路の存在があるのかもしれない。さらにアピコンプレクス門原虫が、その進化の過程でアブシジン酸生合成経路のみを保存し活用してきたとは考えにくい。トキソプラズマを始めとするアピコンプレクス門原虫が、アブシジン酸以外の他の植物ホルモンを産生している可能性は充分考えられる。

参考文献

1. Archibald, J. M. and Keeling, P. J. 2002. Recycled plastids: a 'green movement' in eukaryotic evolution. *Trends Genet.* **18**: 577-584.
2. Chini, E. N., Nagamune, K., Wetzels, D. M. and Sibley, L.D. 2005. Evidence that the cADPR signalling pathway controls calcium-mediated microneme secretion in *Toxoplasma gondii*. *Biochem. J.* **389**: 269-277.
3. Dubey, J. P. 2007. The histology and life cycle of

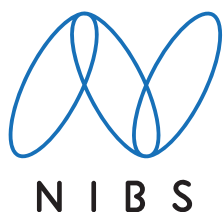
- Toxoplasma gondii*. pp. 1–17. In : *Toxoplasma gondii*, (Weiss, L.M. and Kim, K. eds.) Academic Press.
4. Kasper, L. H. and Buzoni-Gatel, D. 1998. Some opportunistic parasitic infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. *Parasitol Today*. **14** : 150–156.
 5. Levine, N.D. 1988. The Protozoan Phylum Apicomplexa, CRC Press.
 6. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5** : 607–625.
 7. Moore, R. B., Obornik, M., Janouskovec, J., Chrudimsky, T., Vancova, M., Green, D. H., Wright, S. W., Bolch, C. J., Heimann, K., Slapeta, J., Hoegh-Guldberg, O., Logsdon, J. M. and Carter, D.A. 2008. A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature*. **451** : 959–963.
 8. Nagamune, K., Hicks, L. M., Fux, B., Brossier, F., Chini, E. N. and Sibley, L. D. 2008. Abscisic acid controls calcium-dependent egress and development in *Toxoplasma gondii*. *Nature*. **451** : 207–210.
 9. Okamoto, N. and McFadden, G. 2008. The mother of all parasites. *Future Microbiol.* **3** : 391–395.
 10. Ralph, S. A., van Dooren, G.G., Waller, R. F., Crawford, M. J., Fraunholz, M. J., Foth, B. J., Tonkin, C. J., Roos D. S. and McFadden, G.I. 2004. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nat. Rev. Microbiol.* **2** : 203–216.
 11. Sibley L. D. 2004. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*. **304** : 248–253
 12. Wellems, T. E., Hayton, K. and Fairhurst, R. M. 2009. The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities. *J. Clin. Invest.* **119** : 2496–2505.
 13. WHO 1999. World Health Organization Report on Infectious Diseases : Removing obstacles to healthy development.

編集後記

春光うらかな季節となりました。皆様におかれましてはいかがお過ごしでしょうか。

さて今年度の編集委員で行ってまいりました編集作業も、今号を持って終了致します。不慣れな点から行き届かない部分が多々ありましたことを、この場をお借りし深くお詫び申し上げます。次年度は、「堤 信幸」「大嶋 篤」「山下 龍」が編集を担当致します。読者の皆様におかれましては、季節柄どうかご自愛ください。今後とも、引き続き日生研たよりを御愛読賜りますよう、宜しくお願ひ申し上げます。

(編集委員長)



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻573号) 平成24年2月25日印刷 平成24年3月1日発行(第58巻第2号)
 発行所 財団法人 日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
 TEL : 0428(33)1056(企画学術部) FAX : 0428(33)1036
 発行人 林 志鋒
 編集室 委員/平 修(委員長), 堤 信幸, 黒田 丹
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)