

氏 名 (国籍)	金 廷 娟 (大韓民国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第164号
学 位 授 与 年 月 日	平成16年9月17日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Comparative Genome Analysis of Theileria Parasites and Vaccine Development against <i>T. orientalis</i> (<i>Theileria</i> 原虫の比較ゲノム解析と <i>T. orientalis</i> に対 するワクチン開発に関する研究)
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教授 杉 本 千 尋 副査 帯広畜産大学 教授 藤 崎 幸 蔵 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教 授 加茂前 秀 夫 副査 岐 阜 大 学 教 授 福 士 秀 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

タイレリアはマラリア原虫、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、バベシアなど医学、獣医学上重要な原虫と同じくアピコンプレックス門に分類される病原性原虫である。牛小型ピロプラズマ原虫と呼称される *T. orientalis* による被害は、アジア（日本、韓国、中国）を中心に報告されており、病気の主徴は原虫の赤血球内寄生に起因する貧血と黄疸である。これらのタイレリアに対して現在までに開発されたワクチンの有用性や安全性は限られている。そこで、本研究は *T. orientalis* のゲノムあるいは cDNA 解析を通じて、赤血球内発育段階で発現し、ワクチン開発への応用が期待できる新規抗原を検索することを目的とし、3 種の新規蛋白質の分子生物学的ならびに免疫学的性状解析を行った。

第 1 章と第 2 章では、*T. orientalis* ゲノム解析から、2 つのゲノム DNA 断片を得て、それぞれにコードされる 2 つの蛋白質遺伝子 (ToORF2, ToORFb) を組換え体として発現し、それらの性状解析をした結果、ワクチン候補遺伝子となりうることを示唆した。

第 3 章では、*T. parva* の microneme-rhoptry protein と相同性を示す cDNA クローンを同定し (ToMRP)、蛋白質としての性状や機能の解析を行い、赤血球ステージの初期と後期に発現されることを明らかにした。さらに、ToMRP は赤血球膜の蛋白質である band 3 に特異的に結合することを証明した。この結果、本分子が赤血球膜蛋白質と相互作用し、原虫の赤

血球への侵入あるいは脱出にかかわっていることが示唆された。

既に国内に分布する原虫株の表面抗原遺伝子 (MPSP) の多様性が報告されており、ワクチン開発を進める上で最近の野外株に関する情報を集積する必要性があるため、日本各地に分布するタイレリア原虫の疫学調査を行った結果、従来日本に見出されていない遺伝型の原虫の存在を報告した。そこで、この型の原虫の MPSP 遺伝子ならび Small Subunit Ribosomal DNA を詳しく調べて第4章にまとめた。この新しい型のタイレリア原虫は、東南アジアに分布する原虫と相同性を示し、過去に収集された試料にもすでに存在していたことがわかった。本研究から、3つ以上の異なる型のタイレリア原虫が混合感染していることが明らかになり、日本の牛小型ピロプラズマ病の疫学的特性が極めて複雑であることが示された。

本論文第 1-3 章で記載した分子は今まで本原虫種で報告されていない新規分子であり、赤血球内ステージで発現していること、宿主抗体の標的となっていること、赤血球分子と何らかの相互作用を行っていることが明らかとなったことから、今後ワクチンや治療薬開発において標的分子となることが期待される。また第4章では、我が国に分布する *T. orientalis* の遺伝子型が従来報告されてきた以上に多様性に富むことから、ワクチン開発を行う上でより詳細な抗原解析、遺伝子解析が不可欠であることを明らかにした。

審 査 結 果 の 要 旨

タイレリアはマラリア原虫、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、バベシアなど医学、獣医学上重要な原虫と同じくアピコンプレックス門に分類される病原性原虫である。牛小型ピロプラズマ原虫と呼称される *T. orientalis* による被害は、アジア（日本、韓国、中国）を中心に報告されており、病気の主徴は原虫の赤血球内寄生に起因する貧血と黄疸である。これらのタイレリアに対して現在までに開発されたワクチンの有用性や安全性は限られている。本研究では、*T. orientalis* のゲノムあるいは cDNA 解析を通じて、赤血球内発育段階で発現し、ワクチン開発への応用が期待できる3種の新規抗原を見つけ出し、それらの分子生物学的ならびに免疫学的性状解析を行った。

第1章と第2章では、*T. orientalis* ゲノム解析から、2つのゲノム断片を得て、それらに見出された蛋白質コード領域から2つの蛋白質 (ToORF2, ToORFb) を組換え体として発現し、それらの性状解析を行い、ワクチン候補分子となりうることを示唆した。

第3章では、*T. parva* の microneme-rhoptry protein と相同性を示す cDNA クローンを同定し (ToMRP)、蛋白質としての性状や機能の解析を行い、赤血球ステージの初期と後期にその発現があることを観察した。さらに、ToMRP は赤血球膜の蛋白質である band 3 に特異的に結合することを明らかにし、本分子が赤血球膜蛋白質と相互作用することで原虫の赤血球への侵入あるいは赤血球からの脱出にかかわっている可能性があることを示した。

既に国内に分布する原虫株の表面抗原遺伝子 (MPSP) の多様性が報告されており、ワクチン開発を進める上で最近の野外株に関する情報を集積する必要性があることから、第4章では、日本各地に分布するタイレリア原虫の疫学調査を行った。その結果、従来東南アジアに分布するが我が国には見出されていなかった新たな MPSP 型を保有する原虫の混合感染例を報告した。この例のように3つ以上の異なる型のタイレリア原虫が混合感染していることは、我が国の牛小型ピロプラズマ病の疫学的特性が極めて複雑であることを示している。

本論文第 1-3 章で記載した分子は今まで本原虫種で報告がなかった新規分子であり、赤血球内ステージで発現していること、宿主抗体の標的となっていること、赤血球分子と何らかの相互作用を行っていることが明らかとなったことから、今後ワクチンや治療薬開発において格好の標的分子となることが期待される。また第 4 章では、我が国に分布する *T. orientalis* の遺伝子型が従来報告されてきた以上に多様性に富むことから、ワクチン開発を行う上でより詳細な抗原解析、遺伝子解析が不可欠であることを明らかにした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分な価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

題 目 Molecular epidemiological survey of benign *Theileria* parasites of cattle in Japan: Detection of a new type of major piroplasm surface protein gene
著 者 名 Kim, J.-Y., Yokoyama, N., Kumar, S., Inoue, N., Yamaguchi, T., Sentoku, S., Fujisaki, K. and Sugimoto, C.

学術雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 66(3): 251 ~ 256, 2004

題 目 Molecular characterization of *Theileria orientalis* piroplasm protein encoded by an open reading frame (To ORF2) in a genomic fragment

著 者 名 Kim, J.-Y., Yokoyama, N., Kumar, S., Inoue, N., Fujisaki, K. and Sugimoto, C.

学術雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 66(8): 957 ~ 963, 2004

題 目 Identification of a piroplasm protein of *Theileria orientalis* that binds to bovine erythrocyte band 3

著 者 名 Kim, J.-Y., Yokoyama, N., Kumar, S., Inoue, N., Inaba, M., Fujisaki, K. and Sugimoto, C.

学術雑誌名 Molecular and Biochemical Parasitology

巻・号・頁・発行年 : In press

既発表学術論文

題 目 Expression of *Babesia equi* EMA-1 and EMA-2 during merozoite developmental stages in erythrocyte and their interaction with erythrocytic membrane skeleton

著 者 名 Kumar, S., Yokoyama, N., Kim, J. -Y., Huang, X., Inoue, N., Xuan, X., Igarashi, I. and Sugimoto, C.

学術雑誌名 Molecular and Biochemical Parasitology

巻・号・頁・発行年 : 133(2):221 ~ 227, 2004