

氏 名 (国籍)	Mohamad Alaa Hasan Shekh Terkawi (シリア・アラブ共和国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第270号
学 位 授 与 年 月 日	平成21年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3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	Molecular and Immunological Characterizations of Ribosomal Phosphoprotein P0 of <i>Babesia gibsoni</i> (バベシアギブソニーリボソームリン酸タンパク質 P0 の 分子免疫的解析)
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教授 河 津 信一郎 副査 帯広畜産大学 教授 鈴 木 宏 志 副査 岩 手 大 学 教 授 谷 口 和 之 副査 東京農工大学 教授 白 井 淳 資 副査 岐 阜 大 学 教 授 福 士 秀 人

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

バベシア原虫は、野生動物から家畜哺乳類、ヒトに至るまで広く感染が成立する赤血球寄生性原虫である。バベシア症は、無症候キャリアーから致命的なマラリア様病態まで幅広い臨床症状を呈する。*Babesia gibsoni* はイヌバベシア症の病原体で、世界中の多くの地域でイヌへの感染が確認されている。*B. microti* はげっ歯類およびヒトバベシア症の主要な病原体と考えられている。*B. gibsoni* と *B. microti* の交差反応抗原の血清学的同定は、イヌおよびヒトバベシア症の新規コントロール戦略につながるものと思われる。これらの交差反応抗原を同定するために、*B. gibsoni* の cDNA ライブラリを *B. microti* 感染急性期マウス血清でイムノスクリーニングした。その結果、リボソームリン酸タンパク質 P0 (BgP0) がイムノドミナントな抗原としてクローニングされた。次に、BgP0 遺伝子を単離し解析を行った結果、BgP0 遺伝子は *B. gibsoni* ゲノム DNA 中にシングルコピーとして存在し、その ORF 942bp は、314 アミノ酸、34 kDa のタンパク質をコードすることが推定された。大腸菌で発現した GST 融合組換え体 BgP0(rBgP0) に対する抗血清は、*B. gibsoni* および *B. microti* 赤内型原虫ライセートの 34 kDa タンパク質と特異的に反応した。また BgP0 に対する強い免疫反応が、*B. gibsoni* および *B. microti* の急性期および慢性期血清に認められた。さらに、rBgP0 の免疫防御効果を BALB/c マウスを用いて評価したところ、フロイントアジュバントを併用した rBgP0 の腹腔内投与は、同抗原に対する IgG1 および IgG2 a からなる強い液性免疫を誘導した。その結果、これらのマウスは抹消血中での原虫寄生率は上昇が遅れ、かつ、有意に抑制された。次に、*B. microti* 感染に対する、精製抗 BgP0IgG による受動免疫効

果を調べるため 1mg の IgG を SCID マウスに腹腔内投与したところ、12 日間 *B. microti* の増殖が抑制された (第 1 章)。

さらに、他種バベシア原虫の cDNA ライブラリを抗 rBgP0 血清でスクリーニングすることで、BgP0 ホモログを単離した。アミノ酸配列に基づく系統学的解析を行ったところ、BgP0 はこれらホモログと以下の高い相同性を示した。(*B. caballi* P0 (88.1%), *B. bigemina* P0 (85.6%), *B. bovis* P0 (81.4%), *B. equi* P0 (64.9%))。また抗 BgP0 血清を用いた数種のバベシア赤内型原虫ライセートに対するウェスタンブロット解析により、31~34 kDa の関連タンパク質が見いだされた。次に、*B. bovis* 感染に対する抗 BgP0 IgG の防御効果を *in vitro* 培養系で調べた結果、*B. bovis* 増殖は抗 rBgP0 IgG により濃度依存的に抑制され、培養液中濃度 1mg/ml 時には原虫寄生率の有意な抑制が見られた (第 2 章)。

第 1 章、第 2 章に示したデータに基づき、次に、致死的なネズミバベシア感染における補体成分 C3 の役割を明らかにする目的で、*B. rodhaini* 感染での rBgP0 による交差免疫誘導試験を行った。rBgP0 を用いて、C57BL/6 マウス (WT) および C3KO マウス (C3-/-) を免疫した結果、WT マウスには特異的で強い IgG1 および IgG2 から成る液性免疫が誘導され、かつ、脾臓細胞上清中に高い IFN- $\gamma$  産生が認められた。一方、C3-/-マウスではトータル IgG, IgG1, IgG2b が有意に低く、IL-12 および IFN- $\gamma$  の分泌は WT より低い傾向にあった。部分的防御効果は rBgP0 免疫 WT マウスのみに見られ、C3-/-マウス、対照群マウスには見られなかった。これらのマウスは統計学的に有意な原虫寄生率上昇の遅れが見られ、また、致死時期の遅れ、生存率低下の遅れが見られた (第 3 章)。

以上の結果は、他のアピコンプレックス門原虫で報告されているように、P0 がバベシア感染においても強い免疫原性を有することを示唆するものであり、またこの抗原が原虫の細胞内侵入に関与しているという仮説を支持するものでもある。P0 はバベシア原虫属間で広く保存された防御抗原であることから、バベシア症制圧を目的としたユニバーサルワクチン抗原の候補として至適と考察する。さらに、ノックアウトマウスを用いた交差免疫誘導試験の成績から、補体成分 C3 が P0 抗原に対する液性および細胞性免疫応答の調節に関して重要な役割を果たしていることも示唆された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

バベシア原虫は、野生動物から家畜哺乳類、ヒトに至るまで広く感染が成立する赤血球寄生性原虫である。バベシア症は、無症候キャリアーから致命的なマラリア様病態まで幅広い臨床症状を呈する。バベシア症の予防法として、原虫感染血液の接種による計画感染がウシのバベシア症で行われているが、他のバベシア症に対する有効な予防法は開発されていない。本研究では多種バベシア症の予防に有効なユニバーサルワクチンの開発を目的として、イヌバベシア原虫 *B. gibsoni* のリボソームリン酸タンパク質 P0 (BgP0) 抗原について、その分子性状および免疫原性、ならびに他種バベシア症でのワクチン効果を検討した。また、交差免疫誘導試験の成績から、補体成分 C3 が P0 抗原に対する免疫応答の調節に重要な役割を果たしていることを見いだした。

第 1 章では、*B. gibsoni* の cDNA ライブラリをネズミバベシア原虫 *B. microti* 感染マウス血清でイムノスクリーニングして、BgP0 をイムノドミナント抗原としてクローニングし、その性状を解析した。BgP0 遺伝子は *B. gibsoni* ゲノムにシングルコピーとして存在し、314 アミノ酸、34 kDa のタンパク質をコードすることが推定された。

GST 融合組換え体 BgP0 (rBgP0) に対する抗血清は, *B. gibsoni* および *B. microti* 赤内型原虫ライセートの 34 kDa タンパク質と特異的に反応した。*B. gibsoni* および *B. microti* の急性期および慢性期血清は BgP0 と強く反応した。rBgP0 をフロイントアジュバントとともに BALB/c マウスの腹腔内に投与したところ, 同抗原に対する IgG1 および IgG2a からなる強い液性免疫が誘導された。これらマウスでは抹消血中での原虫寄生率の上昇が遅れ, かつ, それが有意に抑制された。精製抗 BgP0IgG で受動免疫された SCID マウスでは, 腹腔内接種後の *B. microti* の増殖が 12 日間抑制された。

第 2 章では, 他種バベシア原虫の cDNA ライブラリを抗 rBgP0 血清でスクリーニングして, 各種 BgP0 ホモログを単離した。アミノ酸配列に基づく系統学的解析ではホモログ間に 64.9~85.6% の高い相同性が認められた。BgP0 血清を用いたウェスタンブロット解析により, 数種バベシア赤内型原虫のライセート中に, 分子量 31~34 kDa の関連タンパク質を見いだした。BgP0 IgG は, *B. bovis* の *in vitro* 培養系での増殖を濃度依存的に抑制し, 培養液中の抗体濃度 1mg/ml で原虫寄生率の有意な抑制が見られた。

第 3 章では, P0 抗原に対する免疫応答での補体成分 C3 の役割を明らかにする目的で, *B. rodhaini* 感染に対する rBgP0 の交差免疫誘導効果をノックアウトマウスで調べた。C57BL/6 マウス (WT) および C3KO マウス (C3-/-) を rBgP0 で免疫したところ, WT マウスには特異的で強い IgG1 および IgG2 から成る液性免疫が誘導され, かつ, 脾臓細胞上清中に高い IFN- $\gamma$  産生が認められた。一方, C3-/-マウスではトータル IgG, IgG1, IgG2b が有意に低く, IL-12 および IFN- $\gamma$  の分泌は WT より低い傾向にあった。有意な原虫寄生率上昇の遅れ, 致死時期の遅れ, 生存率低下の遅れなど, 部分的防御効果は rBgP0 免疫 WT マウスのみに見られ, C3-/-マウス, 対照群マウスには見られなかった。

以上のことから, P0 が他のアピコンプレックス門原虫の感染に同じく, バベシア感染においても強い免疫原性を有することを示唆された。P0 はバベシア原虫属間で広く保存された防御抗原であることから, バベシア症制圧を目的としたユニバーサルワクチン抗原の候補と成り得る。また, ノックアウトマウスを用いた交差免疫誘導試験の成績から, 補体成分 C3 が P0 抗原に対する液性および細胞性免疫応答の調節に関して重要な役割を果たしていることも示唆された。本研究の成果は, バベシア原虫感染に対する宿主免疫応答の解明を大きく前進させ, 将来のバベシア症防圧法の開発につながることを期待される。

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価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目: *Babesia gibsoni* ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against *B. microti* infection in mice

著 者 名: Terkawi, M.A., Jia, H., Zhou, J., Lee, E.G., Igarashi, I., Fujisaki, K., Nishikawa, Y. and Xuan, X.

学術雑誌名: Vaccine

巻・号・頁・発行年: 25 (11): 2027-2035, 2007

- 2) 題 目 : A shared antigen among *Babesia* species: ribosomal phosphoprotein P0 as a universal babesial vaccine candidate  
著 者 名 : Terkawi, M.A., Jia, H., Gabriel, A., Goo, Y.K., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Igarashi, I., Fujisaki, K. and Xuan, X.  
学術雑誌名 : Parasitology Research  
巻・号・頁・発行年 : 102 (1) : 35-40, 2007
- 3) 題 目 : C3 contributes to the cross-protective immunity induced by *Babesia gibsoni* phosphoriboprotein P0 against a lethal *B. rodhaini* infection  
著 者 名 : Terkawi, M.A., Zhang, G., Jia, H., Aboge, G., Goo, Y.K., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Igarashi, I., Kawazu, S.I., Fujisaki, K. and Xuan, X.  
学術雑誌名 : Parasite Immunology  
巻・号・頁・発行年 : 30 (6) : 365-370, 2008

既発表学術論文

- 1) 題 目 : A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay  
著 者 名 : Aboge, G.O., Jia, H., Terkawi, M.A., Goo, Y., Kuriki, K., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Suzuki, H. and Xuan, X.  
学術雑誌名 : Veterinary Parasitology  
巻・号・頁・発行年 : 149 (1) : 85-94, 2007
- 2) 題 目 : *Babesia gibsoni*: identification of an immunodominant, interspersed repeat antigen  
著 者 名 : Jia, H., Terkawi, M.A., Aboge, G.O., Goo, Y.K., Zhou, J., Lee, E.G., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Fujisaki, K. and Xuan, X.  
学術雑誌名 : Experimental Parasitology  
巻・号・頁・発行年 : 118 (1) : 146-149, 2008
- 3) 題 目 : *Babesia gibsoni*: Serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP  
著 者 名 : Goo, Y.K., Jia, H., Aboge, G.O., Terkawi, M.A., Kuriki, K., Nakamura, C., Kumagai, A., Zhou, J., Lee, E.G., Nishikawa, Y., Igarashi, I., Fujisaki, K. and Xuan, X.  
学術雑誌名 : Experimental Parasitology  
巻・号・頁・発行年 : 118 (4) : 555-560, 2008