

氏 名 (本籍)	櫻 井 達 也 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第268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	Elucidation of Molecular Mechanism of Metacyclogenesis -Trypanosome-derived Adhesion Molecule- (メタサイクロジェネシスの分子メカニズム解明 ～トリパノソーマ由来接着分子～)
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 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 教 授 板 垣 匡 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 福 士 秀 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

Trypanosoma congolense (Tc)は家畜アフリカトリパノソーマ症の病原体であり、ツエツエバエにより媒介される。Tcがツエツエバエによって媒介されるためにはハエ体内で一連の細胞分化過程を経る必要がある。すなわち、吸血にともなってツエツエバエに取り込まれた血流型(BSF)は、中腸内で自由遊泳しながら活発に分裂増殖するプロサイクリック型(PCF)へと分化する。次に、PCFは口吻内腔に強く接着し、コロニーを形成して分裂増殖するエピマスティゴート型(EMF)へと分化する。最後にEMFは哺乳類感染型のメタサイクリック型(MCF)へと分化し、吸血とともに新たな哺乳動物宿主へと感染する。このEMFからMCFへの分化を特にメタサイクロジェネシスと呼ぶ。本研究ではメタサイクロジェネシスの分子メカニズムを解明することを目的とした。メタサイクロジェネシスの分子メカニズムは未知であるが、EMFの細胞接着がメタサイクロジェネシスに必須であることが報告されている。本研究はEMFの培養上清で処理した培養フラスコの底表面に非接着性のPCFが強く接着する現象を見いだしたことに端を発する。このことから、EMF培養上清には何らかの接着分子、adhesion factor (AF)が存在することが示唆された。そこで、AFがEMFの細胞接着に関与する分子であるという仮説を立て、AFの分子性状を解析した。まず、EMF培養上清で処理したフラスコ底表面を過ヨウ素酸またはプロテナーゼKで処理しPCFを播種した。その結果これらの処理によってPCFの接着が阻害された。したがってAFは糖タンパク質で、糖鎖が接着活性に必須であることが強く示唆された。次にEMF培養上清から飽和硫酸塩析法で天然型AFを分画した。得られたAF分画をマウスに免疫し抗血清(α -AF)を作製した。 $[^{35}\text{S}]$ 標識 Met/Cys 混合液を用いてEMFを代謝標識し、得られた培養上清を

α -AF で免疫沈降した。その結果、天然型 AF の分子量は 100 kDa であることが明らかとなった(第 1 章)。

次に EMF の cDNA ライブラリーを α -AF でイムノスクリーニングし、2,070 bp の AF 遺伝子をクローニングした。AF 遺伝子の配列をもとに組換え AF (rAF) を作製した。抗 rAF マウス血清(α -rAF)を用いた間接蛍光抗体法により AF が EMF 細胞表面特異的に発現していることを明らかにした。ノーザンブロット法の結果、AF は mRNA レベルでも EMF 特異的に発現していた。 $[^3\text{H}]$ -ethanolamine で EMF を代謝標識し、その培養上清を α -rAF で免疫沈降した。その結果、AF は GPI アンカー性の表在性タンパク質であることが判明した。AF の予想アミノ酸配列は既知のアフリカトリパノソーマ EMF の表在性タンパク質同様、アラニンに富んでいた。そこで AF とそれらのアミノ酸配列の近縁関係を調べる目的で分子系統樹を作成した。その結果 AF は既知のアフリカトリパノソーマ昆虫型表在性タンパクとは全く異なるクラスターを形成することが示唆された。以上の結果から AF は新規の EMF 特異的 GPI アンカー性表在性タンパク質であることが明らかとなった。そこで AF を CESP (*congolense epimastigote-specific protein*) と命名した(第 2 章)。

CESP の詳細な生物機能解析を行うために Tc 用タンパク質強制発現ベクター(pSAK)を構築した。pSAK は Tc ゲノムのチューブリンリピート領域を相同組換えの標的とし、薬剤選択マーカーにはハイグロマイシン耐性遺伝子(*HYG*)を用いた。まずレポーターとして *eGFP* 遺伝子(*EGFP*)を挿入した pSAK を EMF に形質転換した。ハイグロマイシン耐性 EMF を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、緑色蛍光を発していた。pSAK がゲノム中の標的領域に正確に挿入されたことをサザンブロット法と PCR 法で確認した。また、組換え EMF における *HYG* と *EGFP* の発現を RT-PCR 法で確認した(第 3 章)。

最後に CESP の生物機能解析を行った。まず CESP が EMF の接着に関与するか否かを調べるために精製抗組換え CESP 抗体を用いて EMF 接着阻害試験を行った。その結果、EMF の接着は抗体濃度依存的に阻害され、CESP が EMF の細胞接着を担う表在性タンパク質であることが示唆された。次に CESP の強制発現により PCF の表現型が接着性に変化するかどうかを検証した。まず PCF で CESP の強制発現を行うために、マルチクローニングサイトを含むように改良した pSAK (pSAK2) を構築するとともに、組換え PCF 作製法を確立した。次に pSAK2 に CESP 遺伝子を挿入し、PCF に形質転換した。その結果、ハイグロマイシン耐性 PCF が得られ、PCR 法により pSAK2 がゲノム中に挿入されたことを確認した。RT-PCR 法により外来 CESP の発現が確認できたが、ほとんどの組換え PCF は CESP タンパクを発現せず、表現型の変化も観察されなかった(第 4 章)。

本研究により、Tc EMF ステージ特異的表在性タンパク質「CESP」が同定された。CESP は EMF ステージ特異的なマーカーとなると同時に、EMF がツエツエバエの口吻に感染する際の接着分子であることが示唆された。加えて、CESP は既知のアフリカトリパノソーマ昆虫型表在性タンパク質と分子系統学的に全く異なっていたことから、Tc EMF は唾液腺感染型の *T. brucei* EMF とは分子レベルで全く異なるトリパノソーマ・ツエツエバエ相互作用を行っていることも示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

Trypanosoma congolense (Tc) は家畜アフリカトリパノソーマ症の病原体であり、ツエツエバエにより媒介される。吸血にともなってツエツエバエに取り込まれた血流型(BSF)は、中腸内でのプロサイクリック型(PCF)への分化を経て、口吻内腔でエピマスティゴート型(EMF)へと発育する。最後に EMF は哺乳類感染型のメタサイクリック型(MCF)へと分化し、吸血とともに新たな哺乳動物宿主へと感染する。この EMF

から MCF への分化は特にメタサイクロジェネシスと呼ばれ、昆虫と哺乳類宿主間を繋ぐ重要な Tc 発育過程となっている。本研究ではメタサイクロジェネシスの分子メカニズムを解明することを目的として、Tc EMF ステージ特異的表在性タンパク質「CESP」を同定し、その性状を解析し、トリパノソーマ・ツエツエバエ間相互作用における役割を考察した。

第 1 章では、EMF 培養上清中に新たに見いだした接着分子、adhesion factor (AF) の分子性状を解析した。その結果、AF は糖タンパク質で、糖鎖が接着活性に必須であることが強く示唆された。また抗 AF 血清で [³⁵S] Met/Cys 代謝標識 EMF 培養上清を免疫沈降した結果、天然型 AF の分子量は 100 kDa であることが明らかとなった。

第 2 章では、EMF の cDNA ライブラリーを抗 AF マウス血清でイムノスクリーニングして、2,070 bp の AF 遺伝子を単離した。抗組換え AF マウス血清 (α-rAF) を用いた間接蛍光抗体法により AF が EMF 細胞表面特異的に発現していること証明した。 [³H]-ethanolamine で EMF を代謝標識し、その培養上清を α-rAF で免疫沈降して、AF が GPI アンカー性の表在性タンパク質であることを明らかにした。AF と既知のアフリカトリパノソーマ EMF 表在性タンパク質との関連を、分子系統樹を作成して解析したところ、AF は新規の EMF 特異的 GPI アンカー性表在性タンパク質であった。そこで AF を CESP (*congolense* epimastigote-specific protein) と命名した。

第 3 章では、CESP の生物機能解析を目的に、Tc 用タンパク質強制発現ベクター (pSAK) を作製した。pSAK は Tc ゲノムのチューブリンリピート領域を相同組換えの標的とした。薬剤選択マーカにはハイグロマイシン耐性遺伝子 (HYG) を用いた。eGFP 遺伝子 (EGFP) を挿入した pSAK を EMF に形質転換し、ハイグロマイシン耐性 EMF を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、緑色蛍光を発する EMF を観察した。pSAK が標的領域に正確に挿入されたことをサザンブロット法と PCR 法で確認した。

第 4 章では、CESP の生物機能を解析した。抗組換え CESP 抗体を用いた接着阻害試験では、EMF の接着が抗体濃度依存的に阻害され、CESP が EMF の細胞接着を担う表在性タンパク質であることが示唆された。CESP の生物機能を組換え原虫で調べる目的で、マルチクローニングサイトを含むように改良した pSAK (pSAK2) を構築して、組換え PCF 作製法を確立した。pSAK2 に CESP 遺伝子を挿入し、PCF に形質転換した。その結果、ハイグロマイシン耐性 PCF が得られ、PCR 法により pSAK2 がゲノム中に挿入されたことを確認した。RT-PCR 法により外来 CESP の発現が確認できたが、ほとんどの組換え PCF は CESP タンパクを発現せず、表現型の変化も観察されなかった。CESP の PCF での発現については、更に詳細な検討が必要である。

以上のことから、CESP は EMF ステージの特異的なマーカー分子で、同時に EMF がツエツエバエの口吻に感染する際の接着分子であることを示唆された。CESP は既知のアフリカトリパノソーマ昆虫型表在性タンパク質と分子系統学的に異なり、このことから、口吻内腔感染型の Tc EMF は唾液腺感染型の *T. brucei* EMF とは異なる分子メカニズムで、ツエツエバエとの宿主・寄生体関係を維持していることが示唆された。本研究の成果は、トリパノソーマ・ツエツエバエ間相互作用の解明を大きく前進させ、将来のトリパノソーマ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 : Identification and molecular characterization of a novel stage-specific surface protein of *Trypanosoma congolense* epimastigotes
著 者 名 : Sakurai, T., Sugimoto, C. and Inoue, N.
学術雑誌名 : Molecular and Biochemical Parasitology
巻・号・頁・発行年 : 161 (1) : 1-11, 2008

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Efficacy of dipalmitoylphosphatidylcholine liposome against African trypanosomes
著 者 名 : Kuboki, N., Yokoyama, N., Kojima, N., Sakurai, T., Inoue, N. and Sugimoto, C.
学術雑誌名 : The Journal of Parasitology
巻・号・頁・発行年 : 92 (2) : 389-393, 2006
- 2) 題 目 : Evidence for the immunostimulatory effects of low-dose orally delivered human IFN- α in cattle
著 者 名 : Namangala, B., Inoue, N., Kohara, J., Kuboki N., Sakurai, T., Hayashida, K. and Sugimoto, C.
学術雑誌名 : Journal of Interferon and Cytokine Research
巻・号・頁・発行年 : 26 (9) : 675-681, 2006
- 3) 題 目 : ハタケシメジ抽出物がビーグル犬のリンパ球数に及ぼす影響についての基礎的検討
著 者 名 : 山田一孝, 喜澤香織, 櫻井達也, 岸本海織, 室谷直義, 池水智博, 小嶋 靖, 卯川裕一
学術雑誌名 : 日本獣医師会雑誌
巻・号・頁・発行年 : 60 (8) : 585-587, 2007
- 4) 題 目 : 腫瘍の犬3症例に対するハタケシメジ抽出物の使用経験 —リンパ球数の変化について—
著 者 名 : 山田一孝, 喜澤香織, 丹羽理恵, 櫻井達也, 岸本海織, 清水純一郎, 室谷直義, 池水智博, 小嶋 靖
学術雑誌名 : 動物臨床医学
巻・号・頁・発行年 : 16 (4) : 129-132, 2007
- 5) 題 目 : A field study to estimate prevalence of bovine African trypanosomosis in Butaleja district, Uganda
著 者 名 : Jing, Z., Magona, J. W., Sakurai, T., Thekisoe, O. M. M., Otim, C. P., Sugimoto, C. and Inoue, N.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : () : - , 2008 (印刷中)