

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08440

研究課題名(和文) エキノコックス幼虫の持続寄生における寄生虫プロテアーゼの役割解明と阻害剤の探索

研究課題名(英文) Studies on proteinases of Echinococcus multilocularis larva for their survival in the host and search for inhibitors

研究代表者

迫 康仁 (Sako, Yasuhito)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：40312459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エキノコックス幼虫の持続寄生におけるプロテアーゼの活性に関して解析を行った。まず、我々が報告した4種の活性型組換えカテプシン様システインプロテアーゼの大量調製を試みたが成功しなかった。しかしながら、新規のカテプシンL様システインプロテアーゼ(EmCLP3)ならびにマトリックスメタロプロテアーゼ様プロテアーゼ(EmMMP)を同定した。両酵素ともに、タンパク質レベルで発現していることが明らかとなった。さらに、EmCLP3はIgG、アルブミン、コラーゲン、フィブロネクチンなどの宿主分子を分解する活性を有していた。この知見から、エキノコックス幼虫の持続感染にEmCLP3が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed proteinases of Echinococcus multilocularis larva as key molecules on their persistent infection. Large scale preparation of active recombinant enzymes of four cathepsin-like cysteine proteinases reported previously by us was not succeeded. However, we identified novel cathepsin L-like cysteine proteinase (EmCLP3) and matrix metalloproteinase (EmMMP). We confirmed that both enzyme was expressed at protein level in larval stage. Furthermore, we demonstrated that EmCLP3 had an activity to digest host protein molecules such as IgG, albumin, collagen and fibronectin. These results indicated that EmCLP3 involved in the persistent infection of parasite.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：エキノコックス幼虫 システインプロテアーゼ マトリックスメタロプロテアーゼ 宿主分子 分解活性

## 1. 研究開始当初の背景

四類感染症の一つであるエキノкокクス症は、条虫類である多包条虫 *Echinococcus multilocularis* の幼虫ステージである包虫の寄生に起因する疾患であり、新興・再興感染症として重要である。現在日本では、その分布は北海道にほぼ限局されているが、2005年に埼玉県で、2014年に愛知県で捕獲された野犬よりエキノкокクスの虫卵が確認されたとの報告があり、本州への拡大を警戒すべき疾患である。また、世界的にも多包条虫の拡大傾向が報告されている。

好発部位は肝臓が最も多く、ほかに肺、脳、骨髄などにも寄生する。ヒトへの感染は、多包条虫の虫卵(六鉤幼虫)を偶発的に経口摂取することにより成立する。

エキノкокクスは、ヒトがその虫卵を偶発的に経口摂取することにより感染し、主に肝臓に持続寄生する。エキノкокクス幼虫は、寄生した臓器で発育増殖し、その様子は悪性腫瘍に酷似している。つまり、エキノкокクスの胚細胞が寄生した臓器内に浸潤しながら増殖し、小胞を形成していく。その後、臓器を占拠するような形でエキノкокクス幼虫が増大し、致死的な臓器不全を引き起こす。

臨床症状は通常感染後約10年経過しないと、ほとんど出現しない。早期、特に無症状期、の確定診断や治療は、予後の観点から見た場合とても重要である。患者の約1/3は胆汁うっ滞性黄疸を発症し、約1/3は心窩部痛を訴える。残りの患者は、疲労、体重減少、肝肥大などの症状の診察の際に見つかる。

本症の根治的な治療法は外科的処置により病巣を完全に摘出すること以外無い。完全に摘出が出来なかった場合、包虫組織は増殖を継続し再発する。術後や手術が不可能な場合は、寄生虫細胞の微小管形成阻害剤であり、エキノкокクス幼虫の増殖抑制作用があるベンジミダゾール系製剤(アルベンダゾール、メベンダゾール)を用いた化学療法が適用される。しかしながら、化学療法剤の効果は一定ではなく、かつ寄生虫の殺滅作用も観察されないため、根治治療剤としては期待できず、新たな化学療法剤の開発が急務となっている。

化学療法剤の標的分子としてタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)が有望視されている。寄生虫が宿主内で生き延びるには、①宿主の免疫系による排除機構から逃避する、②宿主組織に侵入や浸潤し増殖する、③栄養源としてのタンパク質を効率よく取り込む必要があるが、それを全て担っている多機能な分子がプロテアーゼであるためである。

エキノкокクス幼虫のプロテアーゼの研究は、他の寄生虫に比べて遅れており、それらの詳細な解析を行った報告は申請者のものだけであり、一連の研究にてカテプシンL様システインプロテアーゼおよびカテプシンB様システインプロテアーゼを見出し、ヒトIgG、アルブミン、細胞外マトリックスタ

ンパク質(I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン)を分解できること、また、エキノкокクス幼虫より持続的に分泌されていることを証明した。これらの知見は、プロテアーゼがエキノкокクス幼虫の宿主臓器内での浸潤や栄養取り込みを促進し持続寄生に寄与していることを示唆している。つまり、エキノкокクス幼虫の周囲に分泌されたプロテアーゼが、『細胞外マトリックスタンパク質を分解し、寄生した組織内の細胞間に間隙を作ることにより、寄生虫細胞の浸潤を助長している』、また、『宿主タンパク質を分解し低分子化することにより、消化管を持たないエキノкокクス幼虫の体表からの栄養摂取を手助けしている』と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の第1の目的は、現在までに同定したエキノкокクス幼虫プロテアーゼ(カテプシンL様システインプロテアーゼ EmCLP1 および EmCLP2<sup>1)</sup>、カテプシンB様システインプロテアーゼ EmCBP1 および EmCBP2<sup>2)</sup>)の宿主免疫関連分子に対する分解活性を解析することにある。つまり、エキノкокクス幼虫プロテアーゼが宿主の免疫応答を抑制することにより『宿主によるエキノкокクス幼虫の排除を阻害』し、エキノкокクス幼虫の持続寄生に寄与しているかを明らかにすることを目的としている。

第2の目的は、新規のプロテアーゼ遺伝子のクローニングを行い、その酵素学的性状解析、特に宿主分子(IgG、アルブミン、コラーゲンなど)に対する分解活性を確認し、持続寄生におけるその役割について明確にすることである。

## 3. 研究の方法

### (1)組換えプロテアーゼの発現

①大腸菌を用いた発現：我々がすでに報告しているカテプシンL様システインプロテアーゼ(EmCLP1ならびにEmCLP2)およびカテプシンB様システインプロテアーゼ(EmCBP1ならびにEmCBP2)のシグナルシーケンスを除いた領域の遺伝子をPCRにて増幅後、大腸菌発現用ベクターであるpET28a(+)に連結した。その後、酵素活性を持つ組換え体を発現させるには、ジスルフィド結合を介したタンパク質の正しい立体構造の構築が必要であるため、組換えタンパク質発現用大腸菌でジスルフィド結合形成活性を持つShuffle株に導入した。組換えタンパク質の発現は、0.1mM IPTGで誘導し、発現時の培養温度として、15℃、20℃、25℃の3条件を試みた。

②メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いた発現：上記プロテアーゼのシグナルシーケンスを除いた領域のPCR産物を、*P. pastoris*発現用ベクターであるpGAPα AならびにpPICZ α Aに連結した。その後、*P. pastoris* GS115株にエレクトロポレーションにて導入後、外来遺伝子の高コピー体を高

濃度の組換え体選択薬剤ゼオシンで選択した。pGAPA $\alpha$  A 導入体は培養中の恒常的な発現が、pPICZ  $\alpha$  A 導入体はメタノール存在下で発現が誘導される。この真核生物である酵母を用いた発現系は、ジスルフィド結合を介したタンパク質の正しい立体構造の構築が期待できる。

(2) *P. pastoris*により発現された組換えプロテアーゼの精製：組換え *P. pastoris* を 28°C で 3 日間培養した培養液を回収後、限外濾過法により約 10 倍に濃縮した。濃縮液を緩衝液 A (50 mM sodium acetate, 2.5 mM EDTA, pH4.0) に対して透析した。透析物を陽イオン交換カラム HiTrap SP XL にアプライし、組換えプロテアーゼをカラムに吸着させた。吸着した組換えプロテアーゼは、NaCl 含有の緩衝液 A にて溶出させ、回収した。

(3) 酵素性状解析：精製した精製組換えプロテアーゼのペプチド分解活性の評価は、ペプチド合成基質ならびにタンパク質分子を用いた。ペプチド合成基質の分解は、分解時に生じる蛍光を測定することにより、タンパク質分子の分解は、SDS-PAGE による泳動パターンを解析することにより評価した。また、分解反応液として、クエン酸ーリン酸緩衝液およびトリリス緩衝液を使用した。

(4) 新規のプロテアーゼ遺伝子のクローニング：オープンになっている寄生虫遺伝子のデータベース (WormBase) に登録されているエキノコックス cDNA データベースを検索することにより、プロテアーゼ遺伝子候補を選択した。その後、標的遺伝子を増幅するためのプライマーを作製し、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により全長をクローニングした。全塩基配列を決定後、相同遺伝子との比較を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 組換えプロテアーゼの発現：

① 大腸菌を用いた発現：EmCLP1 ならびに EmCLP2 に関しては、以前酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にて組換え酵素を発現させ、その性状解析を行った。しかしながら、その収量が低かったため、本研究では大量発現が期待される、大腸菌を用いた発現系での調整を試みた。また、活性型酵素には、ジスルフィド結合を介したタンパク質の立体構造構築が必要なため、ジスルフィド結合活性を有する Shuffle 株を使用した。

しかしながら、発現した組換えタンパク質は、試みた全ての温度条件 (15°C、20°C、25°C) で封入体を形成した。変性下で精製後、リフォールディングを試みたが、成功しなかった。② *Pichia pastoris* を用いた発現：ジスルフィド結合の形成ならびに比較的大量の発現が期待されるため、*P. pastoris* の発現系を試みた。その結果、組換え活性プロテアーゼ

の発現は確認できたが、以降の解析に必要な発現量には及ばなかった。

(2) 新規システインプロテアーゼの性状解析

① 遺伝子クローニング：Tsang らの報告ならびに寄生虫遺伝子のデータベース (WormBase) の情報より、我々が報告した 4 種類のシステインプロテアーゼ以外に、4 種類のシステインプロテアーゼが幼虫ステージで発現していることが明らかとなった。その中で、発現コピー数の多い、システインプロテアーゼ (Gene ID: EmuJ\_000477200) に注目し、遺伝子クローニングを行い、そのアミノ酸配列の解析を実施した。その結果、全長遺伝子のクローニングに成功し、それがカテプシン L 様システインプロテアーゼに相同性を示すことが明らかとなった。我々は、このシステインプロテアーゼを EmCLP3 と名付けた。

② 幼虫ステージでの EmCLP3 の発現：EmCLP3 がタンパク質レベルで発現しているかを確認するために、ウサギ抗組換え EmCLP3 抗体を用いて、幼虫ライセートならびに幼虫分泌・排泄 (ES) 抗原に対するイムノブロット解析を行った。その結果、EmCLP3 は分子サイズ約 26.8 kDa の分子として発現していること、また、その一部が幼虫外へ分泌されているこ

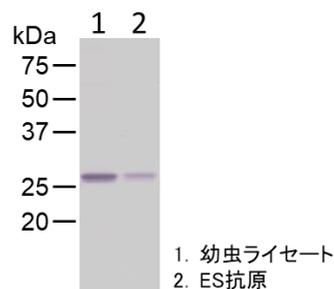


図1 ウサギ抗EmCLP3血清を用いたイムノブロット解析  
とが明らかとなった (図 1)。

③ 組換え活性型 EmCLP3 の発現：EmCLP3 の酵素性状を明らかにするために、*P. pastoris* を用いた発現を試みた。その結果、大量発現ではなかったが、酵素性状を解析に使用するには十分な活性型プロテアーゼを得ることが出来た。

④ ペプチド基質を用いた酵素性状解析：システインペプチダーゼの基質特異性は、その S2 ポケットに結合するアミノ酸により規定される。つまり、それに結合する基質部、P2 部に異なるアミノ酸残基を持つ基質を用いることで、基質特異性を解析することが出来る。そこで、P2 部の異なる 4 種類のペプチド基質、Z-Phe-Arg-MCA (カテプシン B/L の基質)、Z-Val-Val-Arg-MCA (カテプシン S/L の基質)、Z-Leu-Arg-MCA (カテプシン K/S/V の基質)、Z-Arg-Arg-MCA (カテプシン B の基質) を用いて、基質特異性の解析ならびに至適 pH の解析を擬一時反応条件下で行った。その結果、

組換え EmCLP3 は Z-Arg-Arg-MCA に対してはほとんど分解活性を示さなかったが、それ以外の基質については、強い分解活性を示した。また、分解活性を示したペプチド基質を用いて至適 pH の解析を行ったところ、中性域が至適 pH であった。しかしながら、広範な pH

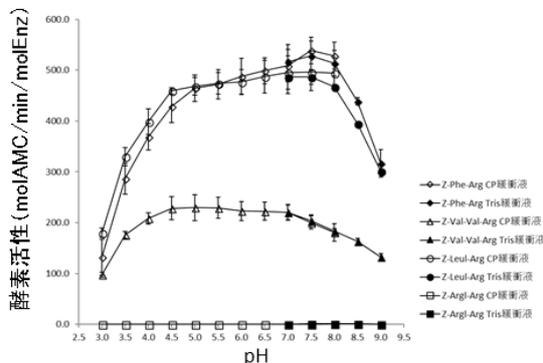


図2 各ペプチド基質に対するpH曲線

で分解活性を示していた (図2)。

⑤タンパク質基質に対する分解活性解析：組換え EmCLP3 のタンパク質分解活性に関して、液性分子基質としてヒトイムノグロブリン G およびヒト血清アルブミン、また、細胞外マトリックス分子基質として I 型および IV 型コラーゲン、フィブロネクチンを用いて、様々な pH 条件下で解析を行った。その結果、組換え EmCLP3 は全ての基質を分解する活性を有していること、その分解活性は、アルブミンに対して以外は、弱酸性下の方が高い傾向にあることが明らかとなった。アルブミンに関しては、中性域の方がより強い分解活性を示していた (図3)。

(3) 新規マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の性状解析：がん細胞の臓器内への浸潤に MMP が深く関与している。エキノコックス幼虫は臓器内へ浸潤し増殖しており、それはがん細胞の特性に酷似していることから、寄生虫 MMP がその浸潤に深く関与している可能性がある。そこで、寄生虫 MMP に関する解析を開始した。

①遺伝子クローニング：システインプロテアーゼと同様に、Tsag らの報告と寄生虫遺伝子データベースの情報を基に、数種類の MMP を見出した。その中で、比較的分子サイズの小さい MMP (Gene ID: EmuJ\_000939100) に注目し、遺伝子クローニングを行い、そのアミノ酸配列の解析を実施した。その結果、全長遺伝子のクローニングに成功し、それがマトリックスメタロプロテアーゼ 7/25 に相同性を示すことが明らかとなった。我々は、このマトリックスメタロプロテアーゼを EmMMP と名付けた。

②幼虫ステージでの EmMMP の発現：EmMMP がタンパク質レベルで発現しているかを確認するために、ウサギ抗組換え EmMMP 抗体を用いて、幼虫ライセートならびに幼虫分泌・排泄 (ES) 抗原に対するイムノブロット解析を

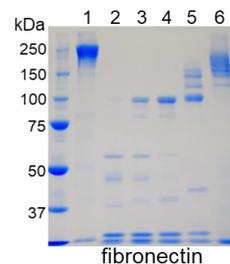
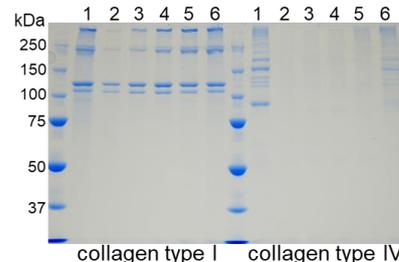
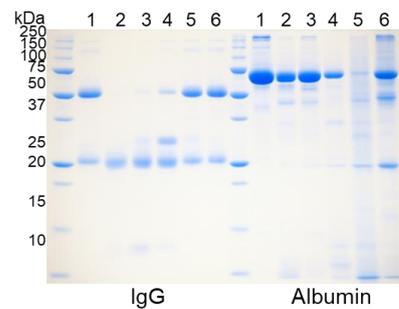


図3 組換えEmCLP3のタンパク質分子に対する分解活性

行った。その結果、幼虫ライセートでは分子サイズ約 75.6kDa および約 68.7kDa の 2 本のバンドが検出された。一方、ES 抗原では EmMMP は検出されなかった。

③組換え活性型 EmMMP の発現：EmMMP の酵素性状を明らかにするために、組換え EmMMP の調整を行った。まず、大腸菌を用いた発現を試みたが、全ての温度条件 (15°C、20°C、25°C) で封入体を形成した。変性下で精製後、リフォールディングを試みたが、成功しなかった。そこで、*P. pastoris* を用いた発現を試みた。その結果、イムノブロット解析で確認出来る程度であるが、可溶性の組換え EmMMP を得ることが出来た。

以上のことより、我々が報告していた EmCLP1、EmCLP2、EmCBP1 ならびに EmCBP2 に関しては、その大量調製が困難であったため、それらの宿主免疫分子に対する活性を明確にすることは出来なかった。一方、新規のプロテアーゼ遺伝子 EmCLP3 および EmMMP のクローニングに成功し、両者とも幼虫ステージで発現していることが明らかとなった。また、EmCLP3 については、イムノグロブリン、アルブミン、コラーゲン、フィブロネクチンなどを含むタンパク質に対する広範な分解活性を示すことから、EmCLP3 がエキノコックス幼虫の持続寄生に関与していることが示唆された。

<引用文献>

- 1) Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, Ito A. Cloning and characterization of cathepsin L-like peptidases of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Mol Biochem Parasitol* 2007;154:181-189.
- 2) Sako Y, Nakaya K, Ito A. *Echinococcus multilocularis*: identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode. *Exp Parasitol* 2011;127:693-701.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Sato MO, Sato M, Yanagida T, Waikagul J, Pongvongsa T, Sako Y, Sanguankiat S, Yoonuan T, Kounnavang S, Kawai S, Ito A, Okamoto M, Moji K: *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia asiatica*, their hybrids and other helminthic infections occurring in a neglected tropical diseases' highly endemic area in Lao PDR. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0006260
- ② Yamashita M, Imagawa T, Sako Y, Okamoto M, Yanagida T, Okamoto Y, Tsuka T, Osaki T, Ito A: Serological validation of an alveolar echinococcosis rat model with a single hepatic lesion. *J Vet Med Sci* 2017;79:308-313
- ③ Sasaki M, Sako Y: The putative serine protease inhibitor (serpin) genes encoded on *Echinococcus multilocularis* genome and their expressions in metacestodal stage. *Vet Parasitol* 2017;233:20-24
- ④ Nkouawa A, Dschanou AR, Moyou-Somo R, Sako Y, Ito A: Seroprevalence and risk factors of human cysticercosis and taeniasis prevalence in a highly endemic area of epilepsy in Bangoua, west Cameroon. *Acta Trop* 2017;165:116-120
- ⑤ Swastika K, Dharmawan NS, Suardita IK, Kepeng IN, Wandra T, Sako Y, Okamoto M, Yanagida T, Sasaki M, Giraudoux P, Nakao M, Yoshida T, Eka Diarthini LP, Sudarmaja IM, Purba IE, Budke CM, Ito A: Swine cysticercosis in the Karangasem district of Bali, Indonesia: An evaluation of serological screening methods. *Acta Trop* 2016;163:46-53
- ⑥ Nkouawa A, Sako Y, Okamoto M, Ito A:

Simple Identification of Human *Taenia* Species by Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification in Combination with Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Am J Trop Med Hyg* 2016;94:1318-1323

- ⑦ Santivanez SJ, Rodriguez ML, Rodriguez S, Sako Y, Nkouawa A, Kobayashi Y, Sotomayor AL, Peralta JE, Valcarcel M, Gonzalez AE, Garcia HH, Ito A: Evaluation of a New Immunochromatographic Test Using Recombinant Antigen B8/1 for Diagnosis of Cystic Echinococcosis. *J Clin Microbiol* 2015;53:3859-3863
- ⑧ Sako Y, Takayanagui OM, Odashima NS, Ito A: Comparative study of paired serum and cerebrospinal fluid samples from neurocysticercosis patients for the detection of specific antibody to *Taenia solium* immunodiagnostic antigen. *Trop Med Health* 2015;43:171-176

[学会発表] (計4件)

- ① サトウ マルセロ オオタケ、サトウ恵、Tiengkhan Pongvongsa、Surapol Sanguankiat、Tipparayat Yoonuan、Kounnavang Senchan、Jitra Waikagul、迫 康仁、柳田哲矢、川合 覚、伊藤 亮、岡本宗裕、門司和彦。ラオス・サワナケート県における3種の *Taenia*; *Taenia solium*, *T. saginata* and *T. asiatica* 感染の発生 第86回 日本寄生虫学会大会 2017年5月28日~5月29日、札幌、日本
- ② 佐々木瑞希、迫 康仁。多包虫は宿主の補体活性を阻害する -多包虫セリンプロテアーゼインヒビターのはたらき- 第85回 日本寄生虫学会大会 2016年3月19日~3月20日、宮崎、日本
- ③ 柳田哲矢、Swastika Kadek、Dharmawan Noman、Wandra Toni、佐藤 宏、迫 康仁、伊藤 亮、岡本宗裕。バリ島およびニューギニア島における有鉤条虫の遺伝的多様性とその起源 第85回 日本寄生虫学会大会 2016年3月19日~3月20日、宮崎、日本
- ④ Nkouawa Agathe、Ito Akira、Sako Yasuhito。Development of a simple identification of human *Taenia* species by using multiplex LAMP and dot-ELISA. 64th American Society of Tropical Medicine & Hygiene Annual Meeting, 2015年10月25日、フィラデルフィア、米国

[図書] (計2件)

- ① 迫 康仁 (分担) (2016年): 人獣共

通感染症、医薬ジャーナル社、  
pp. 511-515.

- ② 迫 康仁 (分担) (2018年): シンプル微生物学、南江堂、pp. 381-395.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

迫 康仁 (SAKO, Yasuhito)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 40312459

### (3) 連携研究者

岡本宗裕 (OKAMOTO, Munehiro)  
京都大学・霊長類研究所・教授  
研究者番号: 70177096

佐々木瑞希 (SASAKI, Mizuki)  
旭川医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 00632126