

令和元年6月7日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08030

研究課題名(和文) アフリカトリパノソーマ原虫メタサイクロジェネシスの分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of African trypanosome metacyclogenesis

研究代表者

櫻井 達也 (SAKURAI, Tatsuya)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60547777

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)：本研究はTrypanosoma congolenseのベクターステージから宿主ステージへの細胞分化の分子メカニズムの解明を目的とする。研究期間中は、効率よく分化誘導可能なメタサイクリック型(ベクター体内型)から血流型(宿主体内型)への分化に焦点を絞り、in vitroで細胞分化を誘導した虫体の蛋白質発現の経時的な変動をLC-MS/MSを用いて網羅的に解析した。その結果、鉄の取り込みに関与すると予想される蛋白質やミトコンドリアの電子伝達系に関係すると予想される蛋白質などの発現量が変動すること、また、上記以外にも発現量が変動する生物機能未知な蛋白質が相当数存在することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アフリカトリパノソーマ原虫は、表面蛋白質の高頻度な抗原変異により宿主の免疫を回避する。そのため、アフリカトリパノソーマ症に有効なワクチンは存在しない。原虫の発育ステージ間の細胞分化は、アフリカトリパノソーマ症制御法を開発する上で有望な標的と目されるが、その分子メカニズムは未解明である。本研究はアフリカトリパノソーマ原虫がベクターステージから宿主ステージへの細胞分化誘導下において発現する蛋白質の量的変動をショットガン解析により網羅的に解析した初めての知見である。今後、この成果はアフリカトリパノソーマ原虫の細胞分化の分子メカニズムの解明に向けた研究を展開する上で有用な情報となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed at elucidating the molecular mechanisms of the differentiation from tsetse fly stage to mammalian stage of Trypanosoma congolense whose lifecycle developments are reproducible in vitro. Using this system, the variation of parasite's protein expression level during the differentiation from metacyclic forms (tsetse fly stage) to bloodstream forms (mammalian stage) was investigated with LC-MS/MS analyses. The results demonstrated that the expression levels of several proteins thought to be involved in important biological processes such as iron uptake and mitochondrial electron transport chain were altered. Besides them, the expression levels of a number of unknown proteins were shown to be altered.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：アフリカトリパノソーマ 発育ステージ 細胞分化 プロテオーム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アフリカトリパノソーマ症

アフリカトリパノソーマ症は、アフリカトリパノソーマ原虫によって引き起こされるヒトと動物の致死性の感染症で、サハラ砂漠以南の36か国で発生がみられる。ヒトのアフリカトリパノソーマ症（アフリカ睡眠病）では、6,000万人が感染の危機に曝されており、毎年5万人の死者を出している。一方、動物のアフリカトリパノソーマ症（ナガナ病）では、年間300万頭のウシが死亡しており、その被害額は年間推定1,000億円以上にのぼるなど、アフリカ諸国の蛋白資源生産と経済に甚大な被害を及ぼしている (Kristjanson *et al.*, 1999, Agricultural Systems)。

(2) アフリカトリパノソーマ症対策の現状

アフリカ諸国の人々の健康と経済発展のためにはアフリカトリパノソーマ症の制圧が急務であるが、最も有効な疾病制御法であるワクチンは存在しない。これはアフリカトリパノソーマ原虫の巧みな寄生戦略に起因する。宿主の血流中に寄生したアフリカトリパノソーマ原虫の細胞表面は、VSG (variant surface glycoprotein) という特異的糖蛋白質で非常に密に覆われている。アフリカトリパノソーマ原虫のゲノム中には抗原性が異なるVSGをコードする1,000以上の遺伝子のレパートリーが存在するとされ、VSGの抗原変異により宿主免疫機構を回避している。このため、宿主に感染する病原体の抗原を免疫する従来法のワクチンでは、アフリカトリパノソーマ症の制御は不可能と考えられている。現在のアフリカトリパノソーマ症の対策としては、感染を拡大させないための患者のスクリーニングと治療、そしてベクターであるツェツェバエ (*Glossina spp.*) の駆除による対策が中心に行われているが、アフリカトリパノソーマ症の制圧には至っていない。このため、新しいコンセプトに基づくより効果的かつ効率的な制御法の開発が求められている。

(3) アフリカトリパノソーマ原虫の生活環と細胞分化

一般に寄生虫病の制御には、その生活環を遮断することが有効であり、アフリカトリパノソーマ症も例外ではないと考えられる。アフリカトリパノソーマ原虫は昆虫（ベクター）と哺乳類（宿主）という全く異なる生活環境に適応するために、細胞分化を伴う複雑な生活環を有している。アフリカトリパノソーマ原虫の生活環は、主に4つの発育ステージで構成される。宿主の血流中に寄生した血流型が吸血時にツェツェバエに摂取されると、中腸内でプロサイクリック型へと分化し、宿主への感染性を失う。プロサイクリック型は、ツェツェバエ体内を移行し、口吻・唾液腺内ステージであるエピマスティゴート型へと分化し、ツェツェバエ組織に強く接着して増殖する。エピマスティゴート型はメタサイクリック型へと分化することで、宿主への感染能を再獲得する。そして、メタサイクリック型が、ツェツェバエの吸血時に唾液とともに新たな宿主へと伝播され、その体内で再び血流型へと分化する。各発育ステージ間の細胞分化は、原虫がそれぞれの寄生環境中で生存するために重要である。中でもベクターステージから宿主ステージへの細胞分化は、原虫が伝播されるために必須の生物現象でありアフリカトリパノソーマ症新規制御法を開発する上で有望な標的と目される。しかし、その分子メカニズムは分子細胞生物学が発展した今日にあってなお、未解明である。その理由として、現在当該研究分野で広く用いられている *Trypanosoma brucei* (ヒトのアフリカトリパノソーマ症の病原体) では、*in vitro* でエピマスティゴート型を培養できないため、詳細な解析を行うに足る量の原虫を調製できないことが挙げられる。原虫感染血液を吸血させることでツェツェバエに感染させ、その体内で原虫をメタサイクリック型まで発育・分化させることも可能ではあるが、ツェツェバエへの感染が成立する確率は低く、またその後の原虫の分離や分子レベルでの解析は非常に困難である。

2. 研究の目的

動物のアフリカトリパノソーマ症の主要な病原体である *T. congolense* には、エピマスティゴート型を含む全発育ステージの培養と各ステージ間の細胞分化の再現が *in vitro* で可能であるという、他のアフリカトリパノソーマ原虫種にはない研究遂行上の利点がある。本研究の目的は、この *T. congolense* の *in vitro* 培養系を用いて、アフリカトリパノソーマ原虫のベクター（ツェツェバエ）ステージが宿主への感染能を再獲得し宿主（哺乳類）ステージへと発育するまでの細胞分化に関係する原虫蛋白質を探索・同定し、細胞分化の分子メカニズムを解明することである。本研究期間中は、最も効率よく分化誘導が可能なメタサイクリック型から血流型への分化に焦点を絞り研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 原虫培養

本研究は、ゲノムプロジェクトにも用いられた標準株である *T. congolense* IL3000 株を用いて実施した。以下の方法で各発育ステージの虫体を調製・維持した。イーグル MEM を基礎培地に Hirumi らが開発した TVM-1 培地を用いてプロサイクリック型虫体を 27 度、大気条件下で培養し、エピマスティゴート型ステージへの細胞分化を誘導する (Hirumi *et al.*, 1992, J. Protozool.). エピマスティゴート型虫体は培養フラスコのプラスチック底面に強力に接着して

増殖し、コロニー状の細胞集塊を形成する。これを、TVM-1 培地を用いて維持すると、非接着性のメタサイクリック型虫体が培養上清中に出現する。

(2) 細胞分化誘導

上記(1)の方法で調製したメタサイクリック型虫体を、陰イオン交換カラム(DE52)を用いて、エピマスティゴート型虫体が混在する培養液中から分離、回収した。回収したメタサイクリック型虫体を、IMDM を基礎培地としてヤギ血清等を添加して調製した HMI-9 培地に懸濁し、33 度、5% CO₂ で培養することで、血流型ステージへの分化を誘導した(Hirumi and Hirumi, 1991, Parasitology)。血流型ステージへの分化は原虫細胞の性状によって評価した。すなわち、メタサイクリック型虫体は非接着性、非増殖性であるのに対して、血流型虫体は *in vitro* では培養フラスコのプラスチック底面に、*in vivo* では宿主の血管内皮細胞に接着して分裂増殖する。細胞分化誘導開始後、経時的に光学顕微鏡下で原虫の表現型を観察することで、血流型ステージへの分化を確認した。

(3) プロテオーム解析

血流型ステージへの分化を誘導したメタサイクリック型虫体を経時的に回収し、プロテオーム受託解析で実績のある一般財団法人化学物質評価研究機構に解析を委託した。同機構では 500 mm の超ロング nanoLC カラムと Q Exactive Plus 四重極/Orbitrap ハイブリッド質量分析計(Thermo Fisher Scientific 社製)を用いた LC-MS/MS 解析が可能であり、これは極めて分解能が高い。送付した各試料は、同機構で還元アルキル化・トリプシン消化処理された後に、上記の系を用いたショットガン解析に供された。得られた MS/MS データの解析には、データベース検索ソフトウェアとして Mascot を、プロテオミクス統計解析ソフトウェアとして Scaffold を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞分化の再現

分化誘導下の虫体の表現型を経時的に観察するとともに、培養フラスコのプラスチック底面上の 100 虫体をランダムに選び、その表現型を記録した(図 1)。その結果、分化誘導開始 1 時間後には接着する原虫が出現し始め、その数は時間経過とともに増加し、そして 9 時間後には細胞分裂する虫体が出現することが確認された。これにより、時間経過とともに接着性・増殖性の血流型が増加すること、再現性をもって効率よく分化誘導可能なことが示された。この結果を基に、本研究では、分化誘導していない虫体と、分化誘導開始後 3 時間、6 時間、12 時間後の虫体をプロテオーム解析の試料とすることとし、各タイムポイントで虫体を回収した。

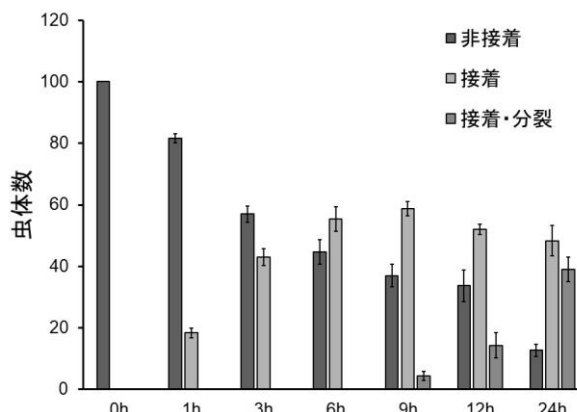


図1 分化誘導下における虫体の表現型

(2) プロテオーム解析

プロテオーム統計解析ソフトウェア(Scaffold)を用いて、分化非誘導および分化誘導開始後 3 時間、6 時間、12 時間後の各タイムポイントの MS/MS データを比較解析し、発現量が変動する蛋白質の数が経時的に増加することが示された。また、解析を通して検出された 2694 種の原虫蛋白質のほとんどについては変動がなかったことから、測定の信頼性が高いと考えられた。そこで、各タイムポイント間のデータを比較解析することで、発現量に経時的な変動が認められた原虫蛋白質のピックアップを試みた(図 2)。細胞分化の進行に伴い発現量が増加した蛋白質としては、鉄イオンの取り込みに関与すると予想される蛋白質などがあつた。逆に発現量が減少した蛋白質としては、ミトコンドリアの電子伝達系に関連すると予想される蛋白質などがあつた。上記以



図2 Scaffoldによる解析結果の一例

外にも発現量に変動が認められた蛋白質が相当数存在したが、その多くは生物機能未知であった。

これまで、メタサイクリック型虫体と血流型虫体の表現型の差異は知られてきたものの、ステージ間の分化過程で、このように実際に発現量に変動する蛋白質を同定した例はほとんどない。この成果は、アフリカトリパノソーマ原虫のベクターステージから宿主ステージへの細胞分化に関する分子レベルの研究に先鞭をつけるとともに、原虫の寄生戦略に関する理解を深める上でも有用な情報となり得ると考えられる。今後、本研究で発現の変動が認められた蛋白質の局在や生物機能等の詳細な解析を実施し、*T. congolense* の細胞分化の分子メカニズム解明に向けた研究を展開していく予定である。また、*T. congolense* と *T. brucei* はほぼ同一の生活環を有する進化系統的に近縁な種であり、細胞分化の分子メカニズムも同一か類似している可能性が極めて高い。よって、本研究の成果は *T. congolense* のみならず *T. brucei* の寄生・適応戦略の分子レベルでの解明にも寄与することが期待できる。将来的に免疫学的手法や薬剤等により原虫の細胞分化を阻害し、その生活環を遮断することができれば、サハラ砂漠以南のアフリカでヒトと動物に甚大な被害を及ぼしているアフリカトリパノソーマ症の新規制御法の開発に繋がると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① Sombié A, Saiki E, Yaméogo F, [Sakurai T](#), Shirozu T, Fukumoto S, Sanon A, Weetman D, McCall PJ, Kanuka H, Badolo A. High frequencies of F1534C and V1016I *kdr* mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Sombandé (Ouagadougou), Burkina Faso. *Trop Med Health* 2019; 47. doi: 10.1186/s41182-018-0134-5. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。