

機関番号：37116

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590435

研究課題名 (和文) 住血吸虫 CRISP ホモログの分子機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of CRISP homologues of schistosome

研究代表者

金澤 保 (KANAZAWA TAMOTSU)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：10194888

研究成果の概要 (和文)：

Venom allergen-like proteins (VALs) は広範囲の生物に存在する分泌タンパク CRISP/SCP/Tpx-1/PR-1 の住血吸虫におけるホモログであり、その生物学的機能は不明である。今回マンスン住血吸虫の VAL 分子の中からいくつかの分子のクローニングに成功した。VAL-3 はマウス脾細胞からの免疫抑制サイトカイン IL-10 の産生増強効果を示した。このことから、VAL 分子が寄生虫による免疫修飾に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Venom allergen-like proteins (VALs) are schistosome homologues of secreted proteins CRISP/SCP/Tpx-1/PR-1 widely distributed among various species of organisms and their biological roles are unknown. In this study we have successfully cloned some of the VAL molecules from *Schistosoma mansoni*. VAL-3 augmented production of an immunosuppressive cytokine IL-10 from mouse spleen cells. This result suggest the possibility that VAL molecules might be involved in the parasite-induced immunomodulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学 (含衛生動物学)

キーワード：感染症 寄生虫 住血吸虫 免疫回避 分泌タンパク CRISP/SCP/Tpx-1/PR-1

1. 研究開始当初の背景

一般に寄生虫は宿主体内でその生活を続けるために、宿主のホメオスタシスに影響を及ぼす様々な物質を分泌・排泄している。その中には、宿主の免疫系を非特異的に刺激し攪乱する物質や、寄生虫本体への攻撃を防ぐ分子煙幕、酸化ストレスからの回避を担う抗酸化タンパクなどが含まれる。種々の網羅的

解析法の進展に伴い、寄生虫の各発育段階のトランスクリプトーム解析や、分泌タンパクのプロテオーム解析が報告されてきているが、各タンパクの生物学的機能の解析はまだその多くが手つかずである。

多様な生物に広く見られる外分泌タンパクのひとつとして、CRISP/SCP/Tpx-1/PR-1 がある。この一群のタンパクは、カビや植物か

ら線虫・昆虫・脊椎動物（ヒトを含む）に至るまで広く存在し、かつそれぞれの生物において多くの場合複数のパラログが存在している。このタンパクに関して生物間で共通する機能は知られていないが、生物毒（ハチ毒、ヘビ毒）に含まれていること、イオンチャネルブロッカーの作用を持つ場合があることや、植物では感染部位にて発現レベルが上昇することなどから、少なくともそのファミリー分子の一部は生体防御に関わる分子であることが推測される。また、線虫におけるホモログ（ASP）の一部は、宿主に免疫することにより感染防御を誘導できる「ワクチン」となり得ることも示唆されていた。住血吸虫に関しては、前述のプロテオーム解析などでこのファミリー分子がいくつか検出され、さらに最近多くの分子の配列情報が venom allergen-like proteins (VALs) として GeneBank に登録されている。しかし、その機能やワクチン効果に関する研究はほとんど行われていなかった。

我々は住血吸虫を用いて発癌機構や免疫応答の研究を行ってきたが、今回分泌タンパクを仲立ちとした宿主寄生体相互作用に注目し、その機能が未だ不明であり多くのパラログをもつ VAL を材料として解析を試みることにした。

2. 研究の目的

(1) VAL 各分子の発育段階ごとの発現プロファイルを明らかにする。

(2) 遺伝子クローニングを行い、可溶性発現または巻き戻し法によって、可溶性の組換えタンパクを得る。

(3) 免疫回避または免疫修飾に関わっている可能性を考え、免疫系細胞の機能への影響を明らかにする。

(4) VAL 分子の抗原性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現プロファイルの解析

マンソン住血吸虫の成虫（雌雄を別々に調製）・セルカリア・虫卵の各発育段階の材料を得て、それぞれについて RNA さらに cDNA を調製する。データベース (GeneBank および SchistoDB) の配列情報をもとに保存領域を避けてプライマーをデザインし、サイバーグリーン法でリアルタイム PCR を行った。

(2) 遺伝子クローニングおよび組換えタンパクの作成

配列情報をもとに、ORF に制限酵素部位を付加したプライマーで pCR2.1 (Invitrogen)

を用いて TA クローニングを行い、その後一部の分子を His-tag 付き発現ベクター pET15b (Takara) へサブクローニングした。また可溶性分画へ発現させるため、pColdTF ベクター (Takara) にもサブクローニングし、発現用大腸菌 BL21 および Origami に導入してコールドショック発現を試みた。封入体となった組換えタンパクはグアニジン塩酸と還元剤 (TCEP または DTT) で変性・可溶化し、Novagen 社製 iFOLD キットを用いて巻き戻しの条件検討を行った。その結果に基づき巻き戻しを行った。その後 AmiconUltra を用いて溶媒を PBS に置換し、タンパク濃度を測定した。一部のサンプルはポリミキシン B アガロース (Sigma) と混和しバッチ法で LPS 除去処理を行った。

(3) 免疫系細胞への影響の解析

正常 C57BL/6 マウスの脾細胞を抗 CD3 抗体または LPS で刺激し、組換え VAL 分子を添加して 48 時間培養し、上清中のサイトカイン (IFN γ 、IL-4、IL-10) を ELISA で測定した。

(4) 抗原性の解析

マンソン住血吸虫感染マウスにおいて VAL 分子が抗原として認識されているかを確認するため、巻き戻した組換え VAL 分子を用いて感染マウス血清との反応性を ELISA で検討した。ペルオキシダーゼ標識抗マウス Ig 抗体を二次抗体として用い、ABTS を基質として発色反応を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現プロファイルの解析

リアルタイム PCR 解析の結果、VAL-1 はセルカリア、VAL-7 はセルカリアとシストソミューラ、VAL-8、12 は成虫、VAL-3, 5, 9, 15, 28 は虫卵において最も高い発現が観察された。これらの多くは既報 (Chalmers IW et al., Developmentally regulated expression, alternative splicing and distinct sub-groupings in members of the *Schistosoma mansoni* venom allergen-like (SmVAL) gene family. *BMC Genomics*. 2008. 9:89.) とほぼ一致したが、加えて VAL-15 および 28 が虫卵に特異的に高発現していることが新たに判明した。

(2) 遺伝子クローニングおよび組換えタンパクの作成

それぞれについて発現レベルの高い発育段階の cDNA を用いて TA クローニングを行った結果、VAL-3, 5, 7, 9, 12, 15 について、クロ

ーニングおよび発現用ベクターへのサブクローニングが成功した。可溶性発現用ベクターである pColdTF にサブクローニングしたのについてコールドショック発現を試みたが、すべての VAL 分子について融合タンパクの発現は認められたものの、可溶性分画への発現は全く認められなかった。pET15b の場合は、VAL-3, 7, 9, 12 について IPTG 誘導による強い発現が認められたが、同様にすべて不溶性であった。このため、封入体として精製し変性・巻戻しを行うこととした。封入体を塩酸グアニジンで変性し希釈法にて巻戻しを試みた結果、L-アルギニン・EDTA・GSH/GSSG を含む CHES 緩衝液において VAL-3 のみ巻戻しに成功した。以後の培養系への添加および感染血清との反応性の検討においては VAL-3 を用いて実験を行った。

(3) 免疫系細胞への影響の解析

マウス脾細胞培養系への添加実験においては、VAL-3 は抗 CD3 抗体刺激による脾細胞の IL-10 産生を顕著に増強した (図 1)。この増強効果は VAL-3 単独の添加によってはほとんど観察されなかったため、T 細胞が刺激を受けた条件下においてのみ生じる現象であると考えられた。また LPS による IL-10 産生は増強しなかった。抗 CD3 抗体刺激下の IL-10 産生増強効果は比較的低濃度 (20 μ g/mL) においてより強く観察され、濃度依存性はみられなかった。抗 CD3 抗体刺激による IFN γ 産生や IL-4 産生については、顕著な影響は観察されなかった (データは示していない)。

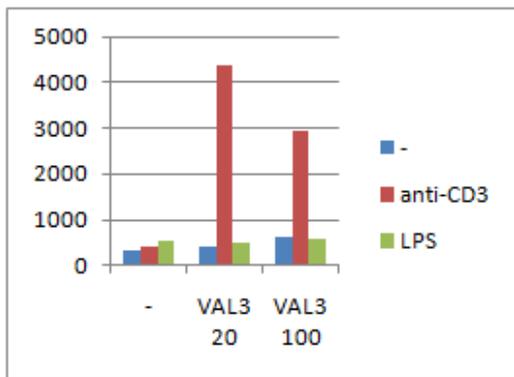


図 1 VAL3 の IL-10 産生増強効果

(4) 抗原性の解析

ELISA によってマンスン住血吸虫感染マウス血清との反応性を検討した結果、VAL-3 に対する抗体を検出した (図 2)。

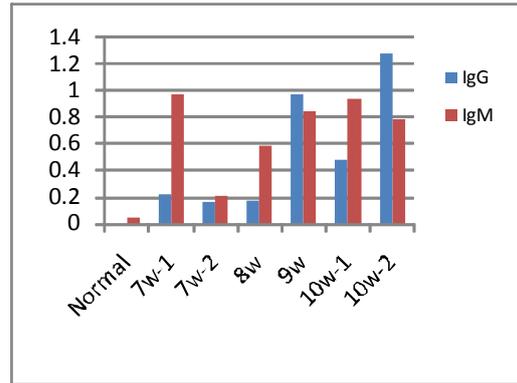


図 2 感染マウス血清の VAL-3 反応性

特に感染後期 (9-10 週) の血清においては、VAL-3 に対する高い IgG 抗体を検出した。

[考察]

本研究において、主要な VAL 分子の遺伝子発現プロファイルを確認し、そのいくつかのクローニングに成功した。大腸菌の系においてはすべて不溶性の封入体となり、VAL-3 のみ巻戻しによる可溶性タンパクとして得ることができた。VAL ファミリー分子がシステインの多い分子であることから、分子内 S-S 結合の多さが可溶性発現や巻戻しの困難さに関係している可能性が考えられた。VAL-3 が免疫抑制サイトカインである IL-10 の産生増強効果を示したことから、この分子を含む VAL 分子が住血吸虫による免疫修飾に関与している可能性が考えられる。特に VAL-3 は虫卵特異的に発現する分泌タンパクであることを考え併せると、虫卵のもつ多彩かつ強力な免疫修飾機能の一部を担っている可能性がある。

また、感染マウスにおいて VAL-3 に対する特異抗体が産生されていることが判明し、VAL 分子が免疫診断用の抗原として虫卵の代わりに利用できる可能性も示唆された。

[今後の展開]

他の免疫細胞 (マクロファージ、DC など) に対する VAL-3 の影響を *in vitro* で解析する。VAL-3 で得られる知見に関する確認および他のクローニング済み VAL 分子についての解析を行うために、今後は真核細胞系での発現システムを取り入れ、可溶性タンパクを得る努力を継続する。また、VAL-3 をマウスに投与することによるマウスの免疫機能の変化を解析する。特に、我々は関節炎や I 型糖尿病など種々の炎症性疾患モデルに対する住血吸虫の抑制効果とその機序を明らかにしつつあるので、それらの実験系における VAL 分子の炎症抑制効果を検証することを考

えている。また、VAL-3 に対するモノクローナル抗体を作成し虫卵（およびミラシジウム）における局在や、中和による宿主またはミラシジウムに対する影響を解析する。セルカリアあるいはシストソミュラに発現する VAL 分子（VAL-1,7 など）の可溶性タンパクが得られれば、マウスに免疫して感染防御効果を検証する。これらの研究により得られるであろう知見は、現在なおほとんど解明されていない住血吸虫 VAL 分子の機能解明の一助となることが期待される。

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 4 件）

- ① Osada Y, Kanazawa T. Parasitic helminths: New weapons against immunological disorders. Special Issue “Immunology and Cell Biology of Parasitic Diseases” *J Biomed. Biotechnol.* 2010;2010:743758. (査読あり)
- ② Kato-Hayashi N, Kirinoki M, Iwamura Y, Kanazawa T, Kitikoon V, Matsuda H, Chigusa Y. Identification and differentiation of human schistosomes by polymerase chain reaction. *Exp Parasitol.* 2010. 124(3):325-9. (査読あり)
- ③ Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. Schistosoma mansoni infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. *Int J Parasitol.* 2009. 39(4):457-64. (査読あり)
- ④ Kumagai T, Osada Y, Ohta N, Kanazawa T. Peroxiredoxin-1 from *Schistosoma japonicum* functions as a scavenger against hydrogen peroxide but not nitric oxide. *Mol Biochem Parasitol.* 2009. 164(1):26-31. (査読あり)

〔学会発表〕（計 10 件）

- ① Osada Y. Experimental *Schistosoma mansoni* infection suppresses autoimmune arthritis in mice. EPS Global-Shanghai 1st International

Biomedicine Forum. 上海, 中国 (2010年9月11日)

- ② Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. Schistosoma mansoni has anti-arthritic effects accompanied with IL-17's down-modulation dependent on viable eggs. XIIth International Congress of Parasitology. Melbourne, Australia. (2010年8月15-20日)
- ③ 長田良雄, 清水少一、熊谷貴、山田壮亮、金澤保. 住血吸虫による関節炎抑制には、炎症性サイトカインの産生抑制が伴う. 第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 北九州 (2010年6月25日)
- ④ 長田良雄, 金澤保. 住血吸虫による Th サイトカイン修飾に関与する因子の解析. 第79回日本寄生虫学会大会. 旭川 (2010年5月21日)
- ⑤ 長田良雄, 金澤保. マウスにおける住血吸虫の抗関節炎・免疫修飾効果の解析. 第39回日本免疫学会総会. 大阪 (2009年12月3日)
- ⑥ 長田良雄, 金澤保. 寄生蠕虫研究の新しい方向性 - 治療薬としての蠕虫の可能性 - 第62回日本寄生虫学会南日本支部大会・第59回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会シンポジウム. 福岡 (2009年11月8日)
- ⑦ 長田良雄, 井上嘉乃、米本知世、金澤保. 住血吸虫卵の炎症性 Th サイトカイン産生に対する影響. 第78回日本寄生虫学会大会. 東京 (2009年3月27日)
- ⑧ Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. Schistosome infection suppresses collagen - induced arthritis in mice. XVIIth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Cheju, Korea (2008年9月29-10月3日)
- ⑨ 長田良雄, 熊谷貴、清水少一、金澤保.

寄生虫感染によるマウス関節炎の抑制.
第 29 回 日本炎症・再生医学会. 東京
(2008 年 7 月 9 日)

- ⑩ 長田良雄、金澤 保. 住血吸虫感染による
関節炎予防効果 -炎症性サイトカイン
の解析- 第 77 回 日本寄生虫学会大会.
長崎 (2008 年 4 月 4 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金澤 保 (KANAZAWA TAMOTSU)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：10194888

(2) 研究分担者

長田 良雄 (OSADA YOSHIO)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80282515

(3) 連携研究者

竹尾 暁 (TAKEO SATORU)
愛媛大学・無細胞生命科学工学研究センタ
ー・講師
研究者番号：40302666