

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780269

研究課題名（和文） 新規予防法開発に向けた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解明

研究課題名（英文） Study on molecular mechanisms of trypanosome cell differentiation for developing novel preventives against the parasite

研究代表者

櫻井 達也 (SAKURAI TATSUYA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：60547777

研究成果の概要（和文）：*Trypanosoma congolense* のメタサイクリック型から血流型への分化を試験管内で誘導し、経時的な蛋白質発現の変化を 2D-DIGE 法により解析した。その結果、6 時間分化誘導した場合、発現量が 1.5 倍以上増加したスポットが 16 スポット、1.5 倍以上減少したスポットが 9 スポット検出された。また、12 時間誘導した場合には、発現量が 2 倍以上増加したスポットが 14 スポット、2 倍以上減少したスポットが 78 スポット検出された。

研究成果の概要（英文）：The cell differentiation from metacyclic form to bloodstream form of *Trypanosoma congolense* was induced *in vitro*, and the alternation of protein expression during the differentiation was analyzed by 2D-DIGE. The results showed that expressions of 15 proteins were increased but those of 9 proteins were decreased more than one and a half times after 6-hour induction of the differentiation. Meanwhile, expressions of 14 proteins were increased but those of 78 proteins were decreased more than twice after 12-hour induction of the differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：感染症、原虫、*Trypanosoma congolense*、細胞分化、2D-DIGE

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、サハラ砂漠以南の 37 のアフリカ諸国で蔓延する致死性の吸血昆虫媒介性原虫感染症である。その致死率は、適切な治療が施されなかった場合、ほぼ 100%に達する。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 (50 万人ともいわれる) の死者が出ている。世界保健機関 (World Health Organization: WHO) による試算によれば、2002 年におけるアフリカトリパノソーマ症の障害調整生存年数 (disability-adjusted life years: DALYs) は約 150 万年にもものぼる。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 万頭ものウシが死亡しており、その被害額は直接的なものだけでも毎年 1,000 億円以上にものぼる。このため、アフリカ諸国のヒトの健康維持と動物性蛋白質資源の生産性の向上による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とされている。

(2) アフリカトリパノソーマ症対策の現状

アフリカトリパノソーマ原虫は、その生活環の全体を通して宿主・ベクターの細胞外に寄生する偏性細胞外寄生原虫である。したがって常に宿主免疫に曝されることになるが、現在に至るまで最も有効な疾病予防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。哺乳類血液中に寄生したアフリカトリパノソーマ原虫は、その細胞表面を密に覆う主要細胞表面蛋白質 VSG (variant surface glycoprotein) の高頻度な抗原変異により宿主免疫を回避する。原虫のゲノム中には抗原性が異なる 1,000 以上の VSG 遺伝子レパートリーが存在するとされるため、哺乳類に寄生する病原体の抗原を免疫する従来法のワクチン開発は事実上不可能である。また、既存の治療薬は、副作用が強いことに加え、薬剤耐性原虫の出現が問題となっており、その予防的な使用は推奨されない。このため、現在は専らベクターであるツエツエバエの駆除などによる対策が取られているが、効率的とは言い難く、アフリカトリパノソーマ症の制圧は困難を極めている。

(3) 新たな標的の探索

以上のような状況から、アフリカトリパノソーマ症に対する新たなコンセプトの予防法開発が求められている。一般に寄生虫病の制圧には、その生活環を分断することが有効であり、アフリカトリパノソーマ原虫についても、例外ではないはずである。そこで現在、原虫が媒介されるために必須なツエツエバエとの相互作用に関する研究や、発育ステージ間の分化の分子メカニズムに関する研究が活発に行われている。中でもツエツエバエ体内型ステージであるメタサイクリック型から宿主体内型ステージである血流型への細胞分化は、特に有望な標的の一つと考えられている。メタサイクリック型は、その細胞周期が G0 期で停止している非増殖性のステージであり、宿主感染時に血流型に分化しなければ増殖できない。したがって、このメタサイクリック型から血流型への細胞分化を阻止することができれば、仮に宿主が原虫に感染したとしても、アフリカトリパノソーマ症を発症することはないと考えられる。しかしながら、この細胞分化の分子メカニズムは、関係する原虫蛋白質を含めて完全に未解明

である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動物のアフリカトリパノソーマ症の主要病原体である *Trypanosoma congolense* のメタサイクリック型から血流型への細胞分化の分子メカニズムを解明することである。*T. congolense* には、試験管内で全発育ステージ原虫の培養と、各ステージ間の細胞分化の再現が可能という、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。本研究は、この培養系を用いたプロテオーム解析により、メタサイクリック型から血流型への細胞分化に関係する原虫蛋白質の同定を目的とし、分化途中における原虫蛋白質の発現の変化を比較解析した。

3. 研究の方法

(1) ツエツエバエ体内型虫体の培養

T. congolense の生活環の内 (図 1)、ツエツエバエ体内型ステージであるプロサイクリック型をツエツエバエ体内ステージ培養用の培地である TVM-1 を用いて 27°C、大気条件下で培養することで、エピマスティゴート型への分化を誘導した。エピマスティゴート型が培養フラスコのプラスチック底面に強力に接着しながら安定に増殖することを確認した後に、この培養上清中に出現するメタサイクリック型を、エピマスティゴート型との細胞表面の荷電の違いを利用して、陰イオン交換カラム (DE52) を用いて分離した。

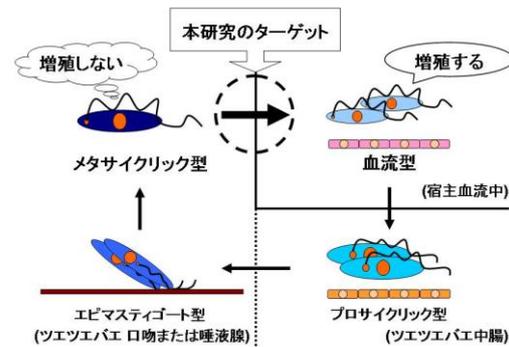


図 1 アフリカトリパノソーマ原虫の生活環と寄生部位、ならびに各発育ステージの特徴を示した模式図

(2) 分化誘導

分離したメタサイクリック型を、過去の報告に従い、ヤギ血清を加えて調製した血流型培養用培地 (HMI-9) に懸濁し、33°C、5% 二酸化炭素条件下で培養することで血流型への分化を誘導した。その際、分化誘導下のメタサイクリック型の挙動を経時的に光学顕微

鏡で観察した。

(3) 蛋白質発現解析

分化誘導をしていないメタサイクリック型と、6時間および12時間分化誘導したメタサイクリック型虫体から総蛋白質を抽出した。その後、二次元電気泳動法をベースにした網羅的な蛋白質発現量の比較解析手法である2D-DIGE (2 Dimensional Fluorescence Differential Gel Electrophoresis)法を用いて、分化誘導をしていないメタサイクリック型と、6時間および12時間誘導したサンプルをそれぞれ比較した。具体的には各サンプルからSample Grinding Kit (GEヘルスケア)を用いて総蛋白質を抽出し、分化誘導をしていない細胞由来のサンプルをCy5で、6または12時間分化誘導したサンプルをCy3で蛍光標識した。その後、分化誘導をしていないサンプルと6時間誘導したサンプル、または12時間誘導したサンプルをそれぞれ等量ずつ混合して二次元電気泳動法で展開した。泳動後のゲル画像を蛍光イメージアナライザーであるTyphoon 9400 (GEヘルスケア)を用いて取り込み、DeCyder 2D Version 7.0 (GEヘルスケア)を用いて定量比較解析を行うとともに、同定対象として切り出すスポットを指定してピックリストを作成した。スポットの切り出しにはSyproRuby染色 (GEヘルスケア)したゲルを用いた。

4. 研究成果

これまで、メタサイクリック型を血流型培養条件下に置くことで、約24時間後には増殖する血流型が出現することが報告されていた。しかしながら、分化途中における細胞の挙動と蛋白質発現の変化を解析した報告はない。そこで本研究を遂行するにあたって、まず分化誘導中の原虫細胞の観察と培養条件の検討から開始した。その結果、分化誘導開始後8時間までには血流型の特徴の一つである接着性をもった細胞が観察された。また、ヤギ血清は一般的な市販品を用いており、ロットの違いが分化に与える影響は認められなかった。しかしながら、一般的な細胞の培養に用いられるウシ胎児血清を用いた場合や、培養温度を37°Cにして分化誘導を行った場合は、メタサイクリック型から血流型への細胞分化は誘導できなかった。このことから、試験管内における分化誘導には培地に加える血清の由来動物と培養温度が重要であることが示唆された。なお、分化した血流型はその後も活発に分裂を続けた。

この結果を基にして、本研究では6時間と12時間分化誘導した原虫細胞から総蛋白質を抽出し、それぞれ分化誘導をしていないメタサイクリック型と2D-DIGE法による蛋白質発現の比較解析を実施した。その結果、6時間

分化誘導した場合、発現量が1.5倍以上増加した蛋白質のスポットが16スポット、1.5倍以上減少した蛋白質のスポットが9スポット検出された (図2)。また、12時間誘導した場合には、発現量が2倍以上増加した蛋白質のスポットが14スポット、2倍以上減少した蛋白質のスポットが78スポット検出された (図3)。これは、長時間分化誘導したサンプル中で発現が変動した蛋白質が増加するという予想通りの結果であり、原虫の分化が経時的かつダイナミックに進行していることを示唆している。また、発現量に差が認められた蛋白質の中に、分化に関わる原虫蛋白質が含まれている可能性が高いと考えられる。

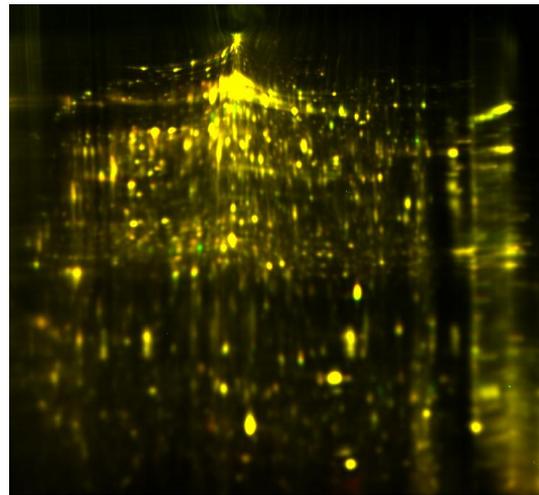


図2 2D-DIGEの結果 (分化誘導6時間) Cy5 (赤)とCy3 (緑)で標識されたスポットの容積比を基に各蛋白質の発現量の差を解析した。

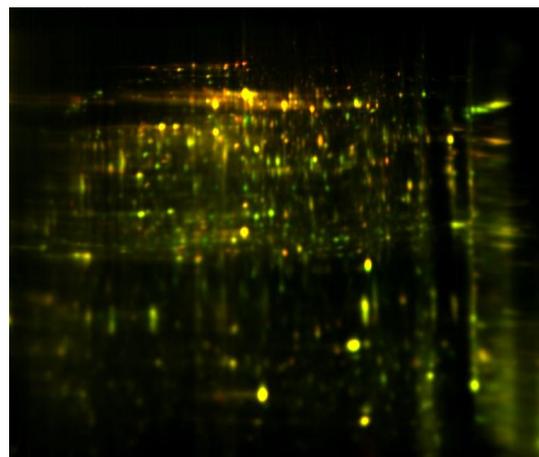


図3 2D-DIGEの結果 (分化誘導12時間) Cy5 (赤)とCy3 (緑)で標識されたスポットの容積比を基に各蛋白質の発現量の差を解析した。

今後は、本研究で発現量の変化が認められた蛋白質を質量分析法（ペプチドマスフィンガープリンティング）により同定し、そのアミノ酸配列から予想される機能ごとに分類する。このうち、リン酸化等のシグナル伝達に関係することが予想される蛋白質を優先的に、その生物機能を阻害剤やRNA干渉法などの逆遺伝学的研究手法を用いて解明していく予定である。機能阻害や発現ノックダウンによりメタサイクリック型から血流型への細胞分化が阻害または促進されれば、分化に関係する原虫蛋白質を同定することができ、ひいては分化の分子メカニズムの解明につながることを期待される。

T. congolense の全発育ステージを試験管内で培養する技術は1980年代から1990年代初頭にかけて確立されたが、本原虫がヒトへの感染性をもたないことなどから、現在の分子生物学の発展を待たずに失われてしまった。しかしながら、アフリカトリパノソーマ症に対するワクチン開発の試みが失敗に終わり、ツエツエバエ体内ステージが注目されるようになるとともに、その有用性が再認識されるようになってきた。そして現在では、ゲノムプロジェクトに加えて、研究代表者も参画して実施したトランスクリプトーム解析により、EST (expression sequence tag) データベースも作製されるに至った。これらはweb上で公開されており、*T. congolense* の遺伝子のクローニング等において極めて有用なツールとなっている。このように、*T. congolense* の分子レベルの研究基盤が整備されつつある中であって、本研究はこの優れた寄生虫学的培養手法と今日の分子生物学的研究手法とを融合させ、メタサイクリック型から血流型への分化の分子メカニズムを追究する点に特色がある。アフリカトリパノソーマ症の感染防御法開発に向け、世界的に様々な研究が精力的に行われているが、本研究はツエツエバエ体内型ステージから宿主体内型ステージへの分化という必須のライフサイクルを標的とする新規アフリカトリパノソーマ症制御法開発の基礎研究となり、極めて独創的である。本研究で用いている *T. congolense* は動物のアフリカトリパノソーマ症の病原体であるが、ヒトのアフリカトリパノソーマ症の病原体である *T. brucei* と近縁種であり、その生活環もほぼ同一である。そのため、両原虫種の細胞分化の分子メカニズムは同一か、類似している可能性が極めて高いと考えられ、本研究は *T. brucei* のメタサイクリック型から血流型への細胞分化の分子メカニズム解明につながる可能性もある。よって、今後得られることが期待される研究成果は、多くの感染者、感染動物を出しているアフリカトリパノソーマ症の新規予防法を開発する上で突破口となりうると考

える。

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5件)

- ① Fujita, M., Kato, H., Gaceres, A. G., Gomez, E. A., Mimori, T., Zhang, F., Iwata, H., Korenaga, M., Sakurai, T., Katakura, K. and Hashiguchi, Y. (2012) Genotyping of sand fly species in Peruvian Andes where leishmaniasis is endemic. *Acta Tropica*. 121: 93-98. 査読有
DOI:10.1016/j.actatropica.2011.10.004
- ② 櫻井達也、井上昇 (2011) アフリカトリパノソーマ症—獣医寄生虫学の挑戦—北海道獣医師会雑誌 55: 211-217. 査読無
URL:<http://www.hokkaido-juishikai.jp/kaishi/pdf/1106-01.pdf>
- ③ Loveless, B. C., Mason, J. W., Sakurai, T., Inoue, N., Razabi, M., Pearson, T. W. and Boulanger, M. J. (2011) Structural characterization and epitope mapping of the glutamic acid/alanine-rich protein from *Trypanosoma congolense*: defining assembly on the parasite cell surface. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(23): 20658-20665. 査読有
DOI:10.1074/jbc.M111.218941
- ④ Eyford, B. A., Sakurai, T., Smith, D., Loveless, B., Hertz-Fowler, C., Donelson, J. E., Inoue, N. and Pearson, T. W. (2011) Differential protein expression throughout lifecycle of *Trypanosoma congolense*, a major parasite of cattle in Africa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 177(2): 116-125. 査読有
DOI:10.1016/j.molbiopara.2011.02.009
- ⑤ Armua-Fernandez, M. T., Nonaka, N., Sakurai, T., Nakamura, S., Gottstein, B., Deplazes, P., Phiri, I. G., Katakura, k. and Oku, Y. (2011) Development of PCR/dot blot assay for specific detection and differentiation of taeniid cestode eggs in canids. *Parasitology International*. 60(1): 84-89. 査読有
DOI:10.1016/j.parint.2010.11.005

〔学会発表〕(計1件)

櫻井達也 Identification and analyses of stage-specific surface protein toward revealing of trypanosome-tsetse interaction. XIIth International Congress of Parasitology. 2010年8月17日 Melbourne, Australia

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 達也 (SAKURAI TATSUYA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：60547777