

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850196

研究課題名(和文) Trypanosoma congolenseの細胞接着分子の同定と立体構造解析

研究課題名(英文) Identification and structural analysis of cell adhesion molecules of Trypanosoma congolense

研究代表者

櫻井 達也 (Tatsuya, Sakurai)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、家畜のアフリカトリパノソーム症の主要な病原体であるTrypanosoma congolenseのエピマスティゴート型および血流型虫体の、ツエツエバエまたは宿主の組織への細胞接着に関する分子の同定を目的とし、その候補となる原虫タンパク質の分子生物学的および生化学的手法による分離と、質量分析による同定を試みた。その結果、エピマスティゴート型虫体からは生物機能未知の細胞表面タンパク質が、血流型虫体からはシアル酸と親和性をもつ未同定のタンパク質が得られた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at identification of cell adhesion molecules of Trypanosoma congolense epimastigotes and bloodstream forms, and isolation of candidate molecules with biochemical and molecular methods followed by its identification with mass spectrometry analyses were carried out. As the result of that, several surface proteins of unknown function and one unknown protein interacting with sialic acid were yielded as candidate proteins from epimastigotes and bloodstream forms, respectively.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：原虫 細胞表面タンパク質 細胞接着

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、ツエツエバエ (*Glossina* spp.) によって媒介されるヒトと家畜の致死性の原虫感染症であり、サハラ砂漠以南、カラハリ砂漠以北に位置する 36 のアフリカ諸国で蔓延している。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) の死者を出している。一方、家畜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 (Kristjansson et al., 1999, Agricultural Systems)。このような家畜のアフリカトリパノソーマ症を引き起こす病原体の中でも、*Trypanosoma congolense* は、最も広範囲に分布し、また病原性が強い。このため、アフリカ諸国の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、*T. congolense* の制圧が急務のとされている。

(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、他の多くの原虫と異なり、その生活環の全体を通して宿主・ベクターの細胞に侵入することはない。したがって、虫体が常に宿主・ベクターの免疫に直接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タンパク質 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 遺伝子の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、効率的とはいえず、アフリカトリパノソーマ症の制圧は困難を極めていいる。

(3) 原虫と宿主・ベクターとの相互作用に関する研究

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。そこで現在、様々な研究がなされるが、中でも特に注目され、また活発に研究されているのが原虫と宿主またはツエツエバエとの相互作用である。そして、その相互作用の中止的役割を果たす原虫細胞表面分子の同定と、その生物機能の解明は最重要課題の一つとされている。

細胞接着は様々な細胞で運動、分化、増殖などに関係する重要な生物現象であるが、*T. congolense* においてもツエツエバエ体内型ステージであるエピマスティゴート型虫体の細胞接着は、宿主感染ステージであるメタサイクリック型への分化 (メタサイクロジェネシス) に必須であることが知られている。また、血流型虫体の宿主の血管内皮細胞への接着は、*in vivo* では接着部位に血管透過性の亢進や虫体の集積がみられ、*in vitro* では細胞分裂時に虫体が接着することから、宿主組織の障害や原虫の増殖に関与するとされている。したがって、これらの細胞接着を阻害できれば、原虫の伝播阻止や増殖抑制が可能と考えられるため、細胞接着は新規の *T. congolense* 制御法を開発する上で有望な標的となると考えられる。しかし、これら細胞接着に関係する分子は未同定であり、細胞接着の分子メカニズムは未解明である。

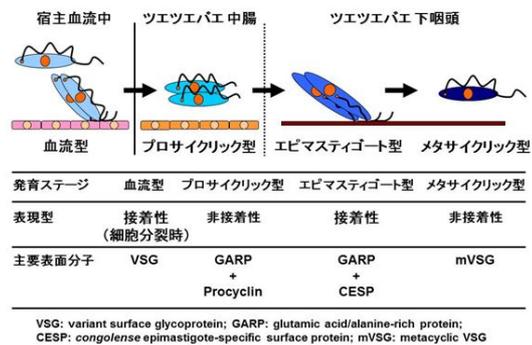


図: *T. congolense* の各发育ステージの表現型 (接着性の有無) と主要表面分子

T. congolense の生活環は、各发育ステージの細胞分化や表面分子の発現、そして細胞接着に至るまで、*in vitro* で再現可能である。血流型虫体は、宿主の血管内皮細胞 (*in vivo*) と初代培養ウシ血管内皮細胞または培養フラスコのプラスチック表面 (*in vitro*) に、エピマスティゴート型虫体は、ツエツエバエの下咽頭内壁 (*in vivo*) と培養フラスコのプラスチック表面 (*in vitro*) に未同定の接着分子で接着し、増殖する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、家畜のアフリカトリパノソーマ症の主要病原体である *T. congolense* のツエツエバエ体内型ステージであるエピマスティゴート型虫体がツエツエバエの下咽頭に接着する際の接着分子と、宿主体内型ステージである血流型虫体が血管の内皮細胞に接着する際の接着分子とを同定し、両发育ステージ虫体の細胞接着の分子メカニズムを解明することである。両发育ステージの細胞接着を、*T. congolense* の全发育ステージ *in vitro* 培養系を用いて再現し、生化学・分子生物学的手法による接着分子の分離と、質量分析による同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 原虫の培養

ツエツエバエ体内型トリパノソーマの培養は Hirumi らの開発した培養法を踏襲して行った (Hirumi et al., 1992, The Journal of Protozoology)。具体的には、イーグル MEM を基礎培地として Hirumi らが開発した培地 (TVM-1) を用いて、プロサイクリック型虫体を 27 °C、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した。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するエピマスティゴート型虫体の出現を確認し、これを TVM-1 を用いて維持した。

血流型虫体の培養は、同じく Hirumi らの確立した方法を踏襲して行った (Hirumi and Hirumi, 1991, Parasitology)。具体的には、エピマスティゴート型虫体の培養上清中に出現するメタサイクリック型虫体を、両虫体の細胞表面の電荷の違いを利用して、陰イオン交換カラム (DE52) を用いて分離し、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を用いて調製した血流型培養用培地 (HMI-9) に懸濁し、33 °C で培養することで血流型への分化を誘導した。プラスチック底面に接着して増殖する血流型の出現を確認し、これを HMI-9 を用いて維持した。

(2) 候補分子の分離

血流型虫体の接着分子は、ウシの血管内皮細胞表面のシアル酸に親和性を持つことが報告されている (Hemphill and Ross, 1995, Parasitology Research)。そこで、血流型虫体のライセートを調製し、そこからシアル酸に親和性を持つ原虫分子を、高シアル酸含有タンパク質であるフェチュインを結合させたアガロースのカラムを用いて分離した。

また、エピマスティゴート型虫体の細胞表面分子を網羅的に分離・解析する目的で、その表面タンパク質を、Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Scientific 社製) を用いてピオチン標識し、細胞を溶解した後にアビジン結合アガロースビーズを用いて分離した。

(3) 質量分析による同定

(2) で得られたサンプルを、それぞれ SDS-PAGE で展開した後に、コロイダルブルークマシー染色 (Invitrogen 社製) し、検出された各バンドを切り出した。切り出したバンドについて、トリプシンによるゲル内消化を行った後に、質量分析 (LC/MS/MS、Thermo Scientific 社製 LTQ Orbitrap) を実施し、得られたデータを基に MASCOT (http://www.matrixscience.com/search_for_m_select.html) を用いてデータベース検索した。

4. 研究成果

血流型虫体の接着分子は、シアル酸に親和性を持つことが知られていた (Hemphill and Ross, 1995, Parasitology Research)。そこで、シアル酸に親和性を持つ原虫分子を、フェチュイン結合アガロースのカラムを用いて分離し、電気泳動したところ、濃縮された単一のバンドが得られた。その質量分析と MASCOT を用いた解析の結果、データベースからアミノ酸配列等に関する情報が得られた。この原虫タンパク質は未同定であり、生物機能、局在、発現パターン等に関する情報は得られなかった。

一方、エピマスティゴート型虫体の接着分子の探索は、細胞表面タンパク質のピオチン標識と、アビジンカラムを用いた分離により実施した。分離したサンプルを電気泳動した後、各バンドに対して質量分析を実施し、MASCOT を用いたデータベース検索を行った。その結果、キネトプラスト類に特徴的なオルガネラであるグライコソームへの局在が予想される解糖系酵素のほかに、CESP (*congolense* epimastigote-specific protein) や MSP (major surface protease) といった生物機能未知の細胞表面タンパク質であることが判明した。なお、エピマスティゴート型虫体の接着分子は、虫体を界面活性剤や高塩濃度の緩衝液で段階的に処理することで精製できることが報告されていたが (Beattie and Gull, 1997, Parasitology)、本研究課題の実施期間中には、これを再現することができなかった。

T. congolense の全発育ステージ、特にエピマスティゴート型を *in vitro* 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。しかし、*T. congolense* がヒトへの感染性をもたないことなどから、ややインパクトに欠け、この技術は、現在の分子生物学の発展を待たずに失われてしまった。そのため、*T. congolense* の細胞接着に関するこれまでの報告は、電子顕微鏡を用いた形態学的観察によるものがほとんどであり、分子レベルでの知見は、ほぼ皆無である。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あらゆる試みが失敗に終わり、特にツエツエバエ体内ステージが注目されるようになる中で、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、web 上で利用できる状態にあり、*T. congolense* に対して質量分析や遺伝子クローニングを実施するための研究基盤が整備されるに至った。

本研究プロジェクトは、この優れた寄生虫学的研究手法と今日の分子生物学的研究手法とを融合させ、エピマスティゴート型および血流型の細胞接着の分子メカニズムを追究する点に特色がある。また、特にエピマスティゴート型の細胞接着は、細胞分化 (メタ

サイクロジェネシス)に必須であることが知られており、その解明は、同じく未解明のメタサイクロジェネシスの分子メカニズムを解明する糸口になる可能性もある。アフリカトリパノソーマ症の感染防御法開発に向け、世界的に様々なワクチン研究が精力的に行われているが、その中において本研究は、宿主・ツエツエバエ組織への細胞接着という、原虫の伝播・増殖・細胞分化に係る生物現象を標的とする新規 *T. congolense* 制御法開発の基礎研究となり、独創的であると自負している。本研究プロジェクトの成果、およびその更なる発展は、原虫と宿主・ベクターとの相互作用の理解につながるのみならず、将来的に免疫学的手法等により原虫の細胞接着を阻害できれば、多くの感染動物を出し、甚大な被害をもたらしている *T. congolense* による家畜の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ている。原虫と宿主・ベクターとの相互作用、特にその組織への細胞接着の分子メカニズム解明に向けて、本研究課題により得られたタンパク質の性状解析および生物機能解析を継続して実施していくとともに、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析の実施等も視野に入れ、今後も研究を遂行していく予定である。

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6件)

Tamura Y, Ohta H, Kashiide T, Matsumoto J, Sakurai T, Yokoyama N, Morishita K, Nakamura K, Yamasaki M, Takiguchi M. (2014) Case report: protein-losing enteropathy caused by *Mesocestoides vogae* (syn. *M. corti*) in a dog. *Veterinary Parasitology*. 205(1-2): 412-5. 査読有
DOI:10.1016/j.vetpar.2014.07.027

Bawm S, Shimizu K, Hirota J, Tosa Y, Htun LL, Maw NN, Thein M, Kato H, Sakurai T, Katakura K. (2014) Molecular prevalence and genetic diversity of bovine *Theileria orientalis* in Myanmar. *Parasitology International*. 63(4): 640-5. 査読有
DOI: 10.1016/j.parint.2014.04.009

Nzelu CO, Kato H, Pupilampu N, Desewu K, Odoom S, Wilson MD, Sakurai T, Katakura K, Boakye DA. (2014) First detection of *Leishmania tropica* DNA and *Trypanosoma* species in *Sergentomyia* sand flies (Diptera: Psychodidae) from an outbreak area of cutaneous leishmaniasis in Ghana.

PloS Neglected Tropical Diseases. 8(2): e2630. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pntd.0002630

Nzelu CO, Gomez EA, Cáceres AG, Sakurai T, Martini-Robles L, Uezato H, Mimori T, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H. (2014) Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid mass-screening of sand flies for *Leishmania* infection. *Acta Tropica*. 132: 1-6. 査読有
DOI:10.1016/j.actatropica.2013.12.016

Alam MZ, Nakao R, Sakurai T, Kato H, Qu JQ, Chai JJ, Chang KP, Schönian G, Katakura K. (2014) Genetic diversity of *Leishmania donovani/infantum* complex in China through microsatellite analysis. *Infection, Genetics and Evolution*. 22: 112-9. 査読有
DOI: 10.1016/j.meegid.2014.01.019

Yamamoto K, Cáceres AG, Gomez EA, Mimori T, Iwata H, Korenaga M, Sakurai T, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H. (2013) Genetic diversity of the mitochondrial cytochrome b gene in *Lutzomyia* spp., with special reference to *Lutzomyia peruensis*, a main vector of *Leishmania (Viannia) peruviana* in the Peruvian Andes. *Acta Tropica*. 126(2): 156-63. 査読有
DOI:10.1016/j.actatropica.2013.02.007

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：