

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18380180
 研究課題名 (和文) プロテオーム解析によるネオスポラ原虫感染機構の解明と新規予防・治療法開発への応用

研究課題名 (英文) **Proteomic analysis of the invading mechanism of *Neospora caninum* and development of novel preventive and treatment methods**

研究代表者
 玄 学南 (XUAN XUENAN)
 国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
 研究者番号：10292096

研究成果の概要 (和文)：本研究では、プロテオミックス法によるネオスポラ原虫の全虫体タンパク質の網羅的解析を行った。MALDI-TOF-MS 解析により約 600 種類の可視化されたタンパク質の中から約 60 種類のタンパク質の同定に成功した。そのうちの一部は原虫の宿主細胞への吸着・侵入ならびにエネルギー代謝に関わるタンパク質であることが示唆された。これらの成果は、ネオスポラ原虫の新規ワクチン・治療薬開発に繋がるものとして期待される。

研究成果の概要 (英文)：The aims of this study were to widen our view on the global expression of protein profile of *Neospora caninum* parasite and to discover vaccine and drug target molecules for control of neosporosis. Approximately 600 protein spots were detected on 2-DE, and 60 proteins were identified by MALDI-TOF-MS analysis. Some of the identified proteins were predicted to be involved in the invasion of the parasite into the host cells and in parasite metabolism. Therefore, some of these proteins could be potential vaccine candidates and drug targets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,500,000	0	4,500,000
2007 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2009 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	15,300,000	3,240,000	18,540,000

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：ネオスポラ、トキソプラズマ、プロテオミックス、ワクチン、治療薬、MALDI-TOF-MS、抗原、酵素

1. 研究開始当初の背景

ネオスポラ原虫 (*Neospora caninum*) は細胞内寄生性病原原虫である。終宿主は犬であり、中間宿主は牛、羊、山羊などである。終

宿主の糞便中に排出されるオーシストによる水平感染や中間宿主における垂直感染により伝搬される。特に牛には流産、死産或いは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高

率に引き起こす。欧米諸国では牛の流産の約40%の原因はネオスポラ原虫感染によるものと報告されている。ネオスポラ原虫感染による流産は、おもに妊娠4-6ヶ月で発生するため、母牛を搾乳に供することができない場合が多く、子牛と搾乳量の損耗などにより、その発生による経済的損失は極めて大きい。世界中に発生が認められ、日本においてもその発生が深刻である。地球規模での被害額は年間数十億USドルにのぼるとの試算もある。しかしながら、いまだにネオスポラ原虫感染症に対する有効なワクチン或いは治療薬は開発されていないのが現状である。その主な理由として、本原虫の感染機構がまだ解明されていないなく、ワクチン・薬剤標的分子が同定されていないことなどが挙げられる。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではプロテオーム解析手法を用いて、ネオスポラ原虫の宿主細胞への吸着・侵入に関わるタンパク質の網羅的同定と新規ワクチン・薬剤標的分子の発掘を目指した。

3. 研究の方法

(1) ネオスポラ原虫の培養と精製

ネオスポラ原虫 NC-1 株を Vero 細胞に増殖させた後に、宿主細胞を極細針を通して破壊し、放出された虫体を密度勾配法により精製した。

(2) 二次元電気泳動 (2-DE) とイムノブロット法による虫体タンパク質の解析

精製虫体を 2-DE 専用緩衝液にて処理した後に総タンパク質を二次元電気泳動にて展開した。二次元泳動後のゲルについてタンパク質染色と特異抗体を用いたイムノブロットをそれぞれ行った。

(3) 画像解析

タンパク質染色とイムノブロット像をコンピュータに取り込み、2-DE 画像解析ソフト (Nonlinear Dynamics) を用いてプロテオームマップ (タンパク質プロファイリング) 及び主要抗原マップ (抗原プロファイリング) を作成した。

(4) MALDI-TOF-MS 法にタンパク質の同定

各スポットのタンパク質をそれぞれ分離し、プロテアーゼで消化した後に、そのペプチド断片を質量分析 (MALDI-TOF-MS) 或いはアミノ酸配列分析 (エドマン分解法) により同定した。

4. 研究成果

(1) 2-DE による虫体全タンパク質及び抗原のプロファイリング

ネオスポラ原虫虫体を溶解し、2-DE にて展開した後に、銀染色により全タンパク質を可視化したところ、約 600 種類以上のタンパク

質スポットが検出された。さらにネオスポラ原虫感染血清を用いて当該虫体タンパク質についてイムノブロットを行ったところ、約 80 種類以上の抗原スポットが検出された。

(2) MALDI-TOF-MS による虫体タンパク質の同定

上記のタンパク質スポット中、61 種類の抗原スポットを含む 150 種類のタンパク質スポットについて MALDI-TOF-MS 法によるタンパク質同定を試みた。その結果、約 60 種類のタンパク質の同定に成功した。そのうち、16 種類は公共のデータベースに登録されたネオスポラ原虫のゲノム情報により同定できた。例えば、NcSAG1・NcSRS2・NcMAG1 などの虫体膜タンパク質; NcMIC1・NcMIC3・NcAMA1・NTPase などのマイクロネーム由来タンパク質; NcGRA2・NcGRA7 などのデンスグラニュー由来タンパク質; NcSUB・NcP0・NcHSP70・NcLAP などその他のタンパク質が挙げられる。これらのうち、約 10 種類のタンパク質はネオスポラ原虫と近縁なトキソプラズマ原虫 (人獣共通感染症を引き起こす) との交差抗原として同定された。

(3) 新規予防・治療法開発への応用

NcHSP70・NcAMA1・NcP0・NcGRA7 に対する特異抗体は、ネオスポラ原虫だけでなくトキソプラズマ原虫の宿主細胞への侵入も阻害することから、これらの抗原は両原虫感染症に対する共通ワクチン候補であることが示唆された。実際、組換え NcAMA1・NcGRA7 を免疫したマウスはネオスポラ原虫のみならずトキソプラズマ原虫に対しても感染防御効果を示した。一方、NcLAP の相同タンパク質である TgLAP はトキソプラズマ原虫のアミノ酸代謝に関わる酵素であり、新規薬剤標的になりうることも明らかとなった。

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 35 件)

- ① Yamagishi, J., Wakaguri, H., Ueno, A., Goo, Y.K., Tolba, M., Igarashi, M., Nishikawa, Y., Sugimoto, C., Suzuki, Y., Watanabe, J., Xuan, X.: High-resolution characterization of *Toxoplasma gondii* transcriptome with a massive parallel sequencing method. DNA Res. (in press) (査読有り)
- ② Nishikawa, Y., Zhang, H., Ibrahim, H.M., Yamada, K., Nagasawa, H., Xuan, X.: Roles of CD122(+) cells in resistance against *Neospora caninum* infection in a murine model. J. Vet. Med. Sci. (in press) (査読有り)
- ③ Kawase, O., Nishikawa, Y., Bannai, H.,

- Matsuo, T., Xuan, X.: Characterization of a novel thrombospondin-related protein in *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Int.* 59: 211-216, 2010. (査読有り)
- ④ Zhang, H., Nishikawa, Y., Yamagishi, J., Zhou, J., Kojima, N., Yokoyama, N., Xuan, X.: *Neospora caninum*: application of apical membrane antigen 1 encapsulated in the oligomannose-coated liposomes for reduction of offspring mortality from infection in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* 125: 130-136, 2010. (査読有り)
- ⑤ Jia, H., Nishikawa, Y., Luo, Y., Yamagishi, J., Sugimoto, C., Xuan, X.: Characterization of a leucine aminopeptidase from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170: 1-6, 2010. (査読有り)
- ⑥ Bannai, H., Nishikawa, Y., Ibrahim, H., Yamada, K., Kawase, O., Watanabe, J., Sugimoto, C., Xuan, X.: Overproduction of the pro-apoptotic molecule, programmed cell death 5, in *Toxoplasma gondii* leads to increased apoptosis of host macrophages. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 1183-1189, 2009. (査読有り)
- ⑦ Ibrahim, H. M., Bannai, H., Xuan, X., Nishikawa, Y.: *Toxoplasma gondii* cyclophilin 18-mediated production of nitric oxide induces bradyzoite conversion in a CCR5-dependent manner. *Infect. Immun.* 77: 3686-3695, 2009. (査読有り)
- ⑧ Nishikawa, Y., Zhang, H., Huang, P., Zhang, G., Xuan, X.: Effects of a transferring antibody against *Neospora caninum* infection in a murine model. *Vet. Parasitol.* 160: 60-65, 2009. (査読有り)
- ⑨ Nishikawa, Y., Zhang, H., Ikehara, Y., Kojima, N., Xuan, X., Yokoyama, N.: Immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped dense granule protein 7 protects dams and offspring from *Neospora caninum* infection in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 16: 792-797, 2009. (査読有り)
- ⑩ Buates, S., Xuan, X., Igarashi, M., Sugimoto, C., Inoue, N.: The influence of the regulation of *Toxoplasma gondii* TgMIC2 transgene on host cell infection. *J. Protozool. Res.* 18: 79-95, 2008. (査読有り)
- ⑪ Bannai, H., Nishikawa, Y., Matsuo, T., Kawase, O., Watanabe, J., Sugimoto, C., Xuan, X.: Programmed Cell Death 5 from *Toxoplasma gondii*: A secreted molecule that exerts a pro-apoptotic effect on host cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 159: 112-120, 2008. (査読有り)
- ⑫ Nishikawa, Y., Zhang, H., Ibrahim, H. M., Ui, F., Ogiso, A., Xuan, X.: Construction of *Toxoplasma gondii* bradyzoite expressing the green fluorescent protein. *Parasitol. Int.* 57: 219-222, 2008. (査読有り)
- ⑬ Takashima, Y., Suzuki, K., Xuan, X., Nishikawa, Y., Unno, A., Kitoh, K.: Detection of the initial site of *Toxoplasma gondii* reactivation in brain tissue. *Int. J. Parasitol.* 38: 601-607, 2008. (査読有り)
- ⑭ Zhang, G., Huong, T., Battur, J., Zhou, J., Zhang, H., Liao, M., Kawase, O., Lee, E.G., Dautu, G., Igarashi, M., Nishikawa, Y., Xuan, X.: A heterologous prime-boost vaccination regime using DNA and a vaccinia virus, both expressing GRA4, induced protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasitology* 134: 1339-1346, 2007. (査読有り)
- ⑮ Kawase, O., Nishikawa, Y., Zhang, H., Zhang, G., Bannai, H., Jin, S., Lee, E.G., Xuan, X.: Proteomic analysis of calcium-dependent secretion in *Toxoplasma gondii*. *Proteomics* 7: 3718-3725, 2007. (査読有り)
- ⑯ Nishikawa, Y., Kawase, O., Vielemeyer, O., Suzuki, H., Joiner, K.A., Xuan, X., Nagasawa, H.: *Toxoplasma gondii* infection induces apoptosis in noninfected macrophages: role of nitric oxide and other soluble factors. *Parasite Immunol.* 29: 375-385, 2007. (査読有り)
- ⑰ Zhang, H., Lee, E.G., Liao, M., Comaore, M., Zhang, G., Kawase, O., Fujisaki, K., Sugimoto, C., Nishikawa, Y., Xuan, X.: Identification of ribosomal phosphoprotein P0 of *Neospora caninum* as a potential common vaccine candidate for the control of both neosporosis and toxoplasmosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 153: 141-148, 2007. (査読有り)
- ⑱ Zhang, H., Compaore, M., Lee, E.G., Liao, M., Zhang, G., Sugimoto, C., Nishikawa, Y., Xuan, X.: Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and anti-NcAMA1 antibody inhibit host cell invasion by both parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151: 205-212, 2007. (査読有り)
- ⑲ Khan, A., Bohme, U., Kelly, K. A., Adlem, E., Brooks, K., Simmonds, M., Mungall, K., Quail, M. A., Arrowsmith, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Harris, D., Collins, M., Fosker, N., Fraser, A., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Murphy, L., O'Neil, S., Rajandream, A., Saunders, D., Seeger, K., Whitehead, S., Mayr, T., Xuan, X., Watanabe, J., Suzuki, Y., Wakaguri, H., Sugano, S., Sugimoto, C., Paulsen, I., Mackey, A. J., Roos, D. S., Hall, N., Berriman,

M., Barrell, B., Sibley, L. D., Ajioka, J. W.: Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of *Toxoplasma gondii*. Genome Res. 16: 1119-1125, 2006. (査読有り)

- ⑳ Laio, M., Ma, L., Bannai, H., Lee, E.G., Zhang, H., Xuan, X., Fujisaki, K.: Identification of a protein disulfide isomerase of *Neospora caninum* in excretory-secretory products and its IgA binding and enzymatic activities. Vet. Parasitol. 139: 47-56, 2006. (査読有り)

〔学会発表〕(計 30 件)

- ① 山岸潤也、渡辺純一、上野晃生、五十嵐慎、若栗浩幸、鈴木讓、玄学南: トキソプラズマの比較トランスクリプトーム解析-ステージ変換機構の解明に向けて-。第 79 回日本寄生虫学会(旭川市)、2010 年 5 月 21 日。
- ② 西川義文、張厚双、賈洪林、張国宏、玄学南: ネオスポラ特異的移行抗体は原虫感染の防御に関与しない。第 149 回日本獣医学会(武蔵野市)、2010 年 3 月 27 日。
- ③ 山岸潤也、渡辺純一、上野晃生、五十嵐慎、若栗浩幸、鈴木讓、菅野純夫、玄学南: 次世代型シーケンサーを用いたトキソプラズマトランスクリプトームの詳細解析。第 148 回日本獣医学会(鳥取市)、2009 年 9 月 26 日。
- ④ 西川義文、張厚双、池原讓、小島直也、横山直明、玄学南: Apical membrane antigen-1 (NcAMA-1)によるネオスポラ垂直感染に対する防御効果。第 148 回日本獣医学会(鳥取市)、2009 年 9 月 26 日。
- ⑤ 西川義文、張厚双、池原讓、小島直也、玄学南、横山直明: オリゴ糖リポソームを用いたネオスポラ垂直感染に対するワクチン開発。第 147 回日本獣医学会(宇都宮市)、2009 年 4 月 3 日。
- ⑥ Xuan, X., Zhang, G., Zhang, H., Nishikawa, Y.: Construction of recombinant *Neospora caninum* expressing TgSAG1 and evaluation of its protective effects against *Toxoplasma gondii* infection in mice. 7th Louis Pasteur Conference (Paris, France), 2008, Nov. 12.
- ⑦ 西川義文、張厚双、玄学南: ネオスポラ感染抵抗性における NK 細胞と NKT 細胞の役割。第 146 回日本獣医学会(宮崎市)、2008 年 9 月 25 日。
- ⑧ 川瀬撰、西川義文、神繁樹、李應具、玄学南: トキソプラズマ原虫におけるカルシウム依存的分泌タンパク質の網羅的同定および動態解析。第 145 回日本獣医学会(相模原市)、2008 年 3 月 29 日。
- ⑨ 西川義文、黄鵬龍、廖敏、張厚双、李應具、玄学南: ネオスポラ感染牛における流産関連分子の検出。第 145 回日本獣医学会(相模原

市)、2008 年 3 月 29 日。

- ⑩ 久保田直樹、坂田義美、宮崎直美、玄学南、猪熊壽: 種特異的 ELISA による全国の犬の抗 *Neospora caninum* 抗体保有状況調査。第 144 回日本獣医学会(江別市)、2007 年 9 月 3 日。
- ⑪ 海野明宏、玄学南、西川義文、鈴木和彦、鬼頭克也、高島康弘: *Toxoplasma gondii* の全身伝搬における血中 free tachyzoite と抹消血細胞感染感染 tachyzoite の関与。第 144 回日本獣医学会(江別市)、2007 年 9 月 3 日。
- ⑫ 熊谷明子、西川義文、周金林、張国宏、賈洪林、中村千夏、玄学南: *Babesia gibsoni* の TRAP 抗原を発現する組換え *Toxoplasma gondii* の作製とその免疫原性の解析。第 142 回日本獣医学会(山口市)、2006 年 9 月 23 日。

〔その他〕

研究室のホームページ (<http://www.obihiro.ac.jp/~geneticbiochem/>)にて関連研究活動・業績等を発信している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玄学南 (XUAN XUENAN)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号: 10292096

(2) 研究分担者 (2006 年度~2007 年度)

横山直明 (YOKOYAMA NAOAKI)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
研究者番号: 80301802

杉本千尋 (SUGIMOTO CHIHIRO)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
研究者番号: 90231373

高島康弘 (TAKASHIMA YASUHIRO)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 20333552

(3) 連携研究者 (2008 年度~2009 年度)

横山直明 (YOKOYAMA NAOAKI)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
研究者番号: 80301802

杉本千尋 (SUGIMOTO CHIHIRO)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
研究者番号: 90231373

高島康弘 (TAKASHIMA YASUHIRO)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 20333552