

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 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：10105
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21380186
 研究課題名（和文）メタサイクロジェネシス関連ベクターパラサイト相互作用の分子機構に関する研究
 研究課題名（英文）Basic study on mechanisms of metacyclogenesis-related vector-parasite relationships
 研究代表者
 井上 昇（INOUE NOBORU）
 帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
 研究者番号：10271751

研究成果の概要（和文）：世界で初めてアフリカトリパノソーマ全発育期のプロテオームおよび EST データベースを作製し、今後のアフリカトリパノソーマ制圧を目指した基礎研究を大きく進展させる研究資源を提供することができた。さらにツェツェバエ体内で同原虫が動物感染型へと分化する発育期にその細胞表面に特異的に発現する CESP 蛋白質を同定し、その発育時期特異的転写翻訳メカニズムの一端を明らかにしたことはベクター体内での原虫発育阻止法を開発する上で大きな一歩と言える。

研究成果の概要（英文）：The world's first whole life-cycle stage proteome and EST data bases were established. These databases could potentially promote basic studies on control measures of human and animal African trypanosomoses. In addition, identification, cloning and characterization of *congolense* epimastigote specific protein (CESP) provided a novel knowledge which enhances further studies on trypanosome control strategies in its vector insect, tsetse.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
H 2 1 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
H 2 2 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
H 2 3 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	11,300,000	3,390,000	14,690,000

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：疾病予防・制御、ツェツェバエ、アフリカトリパノソーマ、生活環、遺伝子転写翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

（1）睡眠病トリパノソーマと家畜のアフリカトリパノソーマ

Trypanosoma congolense（以下 Tc）は家畜に対する病原性が高く、流行するアフリカ諸国では *T. vivax* と並び、家畜トリパノソーマ症対策において最も重要なトリパノソーマ種に位置付けられている。しかしながら近

年これら家畜トリパノソーマ症病原体に関する研究は疫学調査や感染免疫学的研究を除いて殆ど行われていないのが現状である。一方熱帯医学上重要な睡眠病トリパノソーマ (*T. brucei*) に関してはいち早く全ゲノムが解読され、最新の分子生物学的手法を駆使した研究が活発に実施されている。このように家畜トリパノソーマに関する研究は立ち

遅れているが、Tc と *T. brucei* ではツェツェバエ体内での発育増殖に伴う感染部位が異なることから、*T. brucei* 主体で進められてきたアフリカトリパノソーマ研究に獣医寄生虫学領域から新たな知見を加え、まったく新しいトリパノソーマコントロールストラテジーを見出すためにも、Tc 特有のベクターパラサイト相互作用を分子レベルで明らかにする必要がある。

(2) 新たな標的としてのツェツェバエ感染型トリパノソーマ

動物や人に感染するアフリカトリパノソーマ細胞表面は強い抗原性を有する単一糖蛋白質 (VSG) に覆われている。VSG に対する特異抗体はトリパノソーマを効果的に殺滅することから、長年にわたって VSG ワクチン開発に関する研究が実施されてきたが、VSG の高頻度抗原変異が原因でワクチンは実用化していない。一方、ツェツェバエ感染型ステージのトリパノソーマのうちプロサイクリック (PCF) およびエピマスティゴート (EMF) 虫体の既知表面抗原は抗原変異しないことが明らかとなっている。したがって近年、ツェツェバエ感染型ステージのトリパノソーマが新たなワクチン、薬剤の標的として脚光を浴びている。しかし、これら発育ステージ虫体の試験管内培養系が困難であることや、培養系とツェツェバエ感染実験系の両方を実施できる研究者が世界的に少ないことからツェツェバエ感染型トリパノソーマに関する知見は少ない。とくに下咽頭 (Tc) や唾液腺 (*T. brucei*) に接着して動物感染性メタサイクリック虫体へ分化するエピマスティゴート虫体の特異表面抗原に関してはほとんど明らかになっておらず、既知の表面抗原は 2008 年に研究代表者らがクローニングした *congolense* epimastigote-specific protein (CESP) と他研究グループが同定した *brucei* alanine-rich protein (BARP) のみである。

2. 研究の目的

(1) エピマスティゴートの細胞接着関連因子を明らかにする

研究代表者らは平成 16-17 年度に萌芽研究で実施した研究により、Tc エピマスティゴート虫体がツェツェバエの下咽頭内壁に接着するために利用していると考えられる特異表面抗原 CESP を世界に先駆けて発見した (Sakurai ら 2008, Mol. Biochem. Parasitol. Vol. 161)。エピマスティゴート虫体の細胞接着は Tc とツェツェバエとの直接的相互作用であり、かつメタサイクロジェネシスに必須の現象であるが、その詳細は今もって不明である。そこで本研究では CESP の

接着分子としての機能解析を手掛かりに、これまでほとんど明らかになっていない下咽頭におけるエピマスティゴート虫体の細胞接着とそれに伴うメタサイクロジェネシスの分子メカニズムを明らかにすることを目指す。

(2) CESP のエピマスティゴート発育時期特異的転写翻訳機構を明らかにする。

CESP の発現はエピマスティゴート虫体特異的で、同じくツェツェバエ体内ステージであるプロサイクリック型では発現しない。このように厳密な転写翻訳制御が行われていることからエピマスティゴート虫体における CESP の重要性が予想されるため、その転写翻訳制御を明らかにしてツェツェバエ体内ステージを標的とした新たな感染制御法の開発に資する知見を得ることを目指す。

(3) 自然免疫系とツェツェバエのトリパノソーマ感染感受性の関連を明らかにする

ツェツェバエにトリパノソーマ感染が成立する確率は実験室でも数 10% 程度であり、野外ではさらに低い。これはツェツェバエの自然免疫系 (レクチン、抗菌ペプチド、活性酸素) や生理状態、生息環境など様々な要因によってトリパノソーマ感受性が決まることを示唆している。よってツェツェバエに近縁のショウジョウバエを用いて選択した昆虫自然免疫抑制化合物を用いてツェツェバエ体内でのトリパノソーマ発育分化と自然免疫系、特に抗菌ペプチド発現誘導に重要な Imd 経路に着目して研究を実施する。

3. 研究の方法

(1) 既に実施済みの Tc 全発育ステージ虫体タンパク質の網羅的プロテオームデータ

(注 1) を用いて CESP 関連エピマスティゴート接着分子を探索し、遺伝子をクローニングする。プロテオームデータは個々の虫体タンパク質ごとに発現量、相同性検索の結果がリストアップされたマイクロソフトエクセルシートの状態で見られている。特にエピマスティゴート特異的に発現量が増加しているクローンを選択し、アミノ酸配列から DNA プローブを設計して現有のエピマスティゴート cDNA ライブラリーをスクリーニングする。得られた陽性クローンは配列決定、全長 cDNA クローニング、組換えタンパク発現、抗血清作製などを行い、局在部位、遺伝子発現パターンなどを明らかにする。細胞表面タンパク質、細胞骨格、膜貫通タンパク質などが本実験のターゲットとなる。

(注 1) 他の研究資金によって実施したカナダ・ヴィクトリア大学・ピアソン教授との共

同研究である。平成 19 年度に各発育ステージあたり 2,000 程度の虫体タンパク質を安定同位体およびタグペプチド標識し、マスマスペクトロメトリーによる同定と、虫体発育ステージごとの発現量比較を行った（論文番号 5）。

(2) CESP 関連エピマスティゴート接着分子のメタサイクロジェネシスにおける役割の解明。Tc 外来タンパク発現ベクターを用いて各接着分子のノックダウン、過剰発現などを実施する。加えて、ツェツェバエに近縁のショウジョウバエを用いて選択した昆虫自然免疫抑制化合物がツェツェバエ体内発育ステージトリパノソーマの発育分化に与える影響を観察する。

(3) ツェツェバエ完全長 cDNA データベースからの中腸・唾液腺・自然免疫関連遺伝子同定。2008 年 9 月までに連携研究者の杉本教授・渡辺博士らと共同で、ツェツェバエ (*Glossina morsitans morsitans*) 幼虫およびサナギ由来 mRNA からベクタートラッパー法およびオリゴキャップ法によって完全長 cDNA を合成し、それぞれ 5,000 クローンの配列解析を実施した。得られた配列情報は完全長 cDNA データベースとしてウェブサイトにて公開している (http://fullmal.hgc.jp/index_arth.html)。トリパノソーマ・ツェツェバエ相互作用に関与していると予想される中腸タンパク（消化酵素・中腸細胞表面抗原など）、唾液腺タンパク（唾液タンパク、唾液腺細胞表面抗原など）、自然免疫関連遺伝子を検索し、ツェツェバエトリパノソーマ相互作用候補分子をクロニングする。

4. 研究成果

(1) Tc 全発育ステージ虫体のプロテオームおよびディファレンシャルディスプレイを詳細に解析した結果、我々がクロニングした CESP 以外に 3 種類のまったく新規なエピマスティゴート型虫体特異的蛋白質が同定された。一方構築した EST データベースはサンガーセンターから一般に公開 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/T_congolense/EST_index.shtml) され、今後広くトリパノソーマの分子寄生虫学的研究に活用されることが期待される。

(2) 我々が同定したトリパノソーマ・エピマスティゴート型ステージ特異的タンパク質 (CESP) および既によく調べられている表面タンパク質 GARP について、カナダ・ヴィクトリア大学・ピアソン博士と共同で、結晶構造解析を実施した。GARP の構造解析は完了し、論文発表した（論文番号 4）。CESP

については親水性が極めて高いため立体構造解析のための結晶化ができなかったため、今後さらなる検討を要する。これらの成果によって、GARP の基本立体構造が動物感染ステージの表面抗原、VSG と類似していることが判明し、トリパノソーマのステージ変化と表面抗原の変換が密接にリンクしていることが明らかとなった。今後解析を進めていくことで、トリパノソーマの発育ステージ変換に関与する表面抗原の役割が明らかになっていくと期待される。

(3) 試験管内でのメタサイクロジェネシス実験系を用いて様々な培養条件と添加物を試験した結果、熱ショック、低温ショック、プロテアソーム阻害剤（ラクタシスチン）がメタサイクロジェネシスを阻害することを明らかにした。これらの萌芽的研究をさらに追及することにより、ツェツェバエ体内でのトリパノソーマ発育分化を抑制する新たな疾病制御法開発に展開できることが期待される。

(4) CESP の原虫発育時期特異的発現調節メカニズムを明らかにする目的で研究を実施した。エピマスティゴート型ステージは他の発育ステージとは異なり、接着依存性に増殖する点がユニークである。エピマスティゴートの細胞接着は哺乳類感染型原虫への分化に必須であるため、本研究の成果は接着を阻止して原虫の伝播を防ぐ新規感染予防法開発に発展する可能性がある。まず始めに CESP の転写を核 run-on assay で解析した結果、 α -アマンチン感受性 RNA polymerase II によって転写されていることを明らかにした。次に CESP のエピマスティゴート特異的発現調節機構を明らかにするために、その mRNA 3'UTR に着目した。CESP の 3'UTR を eGFP 遺伝子と組合せた発現コンストラクトを作製し、トリパノソーマのゲノムに挿入して mRNA および蛋白質の発現量を各発育ステージで比較した。その結果 CESP 3'UTR を組合せた eGFP の発現はエピマスティゴートステージ特異的であった。以上の結果から CESP 3'UTR には EMF ステージ特異的遺伝子発現を制御する cis-element が存在することが明らかとなった。そこでコアとなる cis-element を同定するため、作製した eGFP 発現カセットの一部の配列を欠損させた deletion mutant を作製し、eGFP の発現をステージ間で比較した。その結果、AU に富むコア cis-element 配列を同定し、さらに cis-element に特異的に結合するエピマスティゴート細胞質由来 RNA 結合蛋白質の存在を RNA ゲルシフトアッセイで証明した。これら一連の成果はアフリカトリパノソーマエピマスティゴート型ステージ特異的遺伝子発

現調節機構を明らかにした初めての報告である (論文番号1および2)。

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9件)

1. 菅沼啓輔、井上昇 (2013) アフリカトリパノソーマの遺伝子発現調節機構、獣医寄生虫学会誌 11: 87-92. 査読有, DOI: なし
2. Suganuma, K., Yamasaki, S., Asada, M., Kawazu, S. and Inoue, N. (2012) The epimastigote stage-specific gene expression of CESP is tightly regulated by its 3' UTR. *Molecular and Biochemical Parasitology* 186 (1) 77-80. 査読有, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2012.09.010
3. Mekata, H., Konnai, S., Mingala, C. N., Abes, N. S., Gutierrez, C. A., Dargantes, A. P., Witola, W. H., Inoue, N., Onuma, M., Murata, S. and Ohashi, K. (2012) Kinetics of regulatory dendritic cells in inflammatory responses during *Trypanosoma evansi* infection. *Parasite Immunology* 34 (6) 318-329. 査読有, DOI: 10.1111/j.1365-3024.2012.01362.x
4. Loveless, B. C., Mason, J. W., Sakurai, T., Inoue, N., Razavi, 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
5. Eyford, B. A., Sakurai, T., Smith, D., Loveless, B. C., Hertz-Fowler, C., Donelson, J. E., Inoue, N. and Pearson, T. W. (2011) Differential protein expression throughout the life cycle of *Trypanosoma congolense*, a major parasite of cattle in Africa. *Molecular & Biochemical Parasitology* 177 (2) 116 - 125. 査読有, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2011.02.009

6. Goto, Y., Duthie, M. S., Kawazu, S., Inoue, N. and Carter, D. (2011) Biased cellular locations of tandem repeat antigens in African trypanosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 405 (3) 434-438. 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.048
 7. Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, K., Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H. and Kita, K. (2010) Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. *Parasitology International* 59 (4) 560 - 564. 査読有, DOI: 10.1016/j.parint.2010.07.006
 8. Goto, Y., Carter, D., Guderian, J., Inoue, N., Kawazu, S. and Reed, S. G. (2010) Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania* amastigotes. *Infection and Immunity* 78 (5) 2138-2145. 査読有, DOI: 10.1128/IAI.01102-09
 9. Helm, J. R., Hertz-Fowler, C., Aslett, M., Berriman, M., Sanders, M., Quail, M. A., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Sakurai, T., Inoue, N. and Donelson, J. E. (2009) Analysis of expressed sequence tags from the four main developmental stages of *Trypanosoma congolense*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 168 (1) 34-42. 査読有, DOI: 10.1016/j.molbiopara.2009.06.004
- [学会発表] (計9件)
1. Suganuma, K. Analysis of the *cis*-element for gene expression regulation in *congolense* epimastigote specific protein (CESP). The 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 2013年8月25日~29日. パース・オーストラリア
 2. 菅沼啓輔、*Trypanosoma congolense* EMF ステージ特異的遺伝子の発現調節機構、

第 155 回日本獣医学会学術集会、2013 年
3 月 28 日～30 日、東京

3. 菅沼啓輔、*Trypanosoma congolense* EMF 特異的遺伝子 *cesp* の発現調節領域の特定、第 20 回分子寄生虫ワークショップ、2012 年 8 月 26 日～29 日、神戸
4. 井上昇、アフリカトリパノソーマ細胞表面分子による宿主認識とトロピズム、第 4 回原虫感染免疫研究会、2011 年 2 月 4 日、長崎
5. 井上昇、新たに同定したアフリカトリパノソーマのツェツェバエ体内ステージ特異的表面分子 CESP について、第 63 回日本寄生虫学会南日本支部会・第 60 回日本衛生動物学会南日本支部会合同大会、2010 年 11 月 6 日、鹿児島
6. 竹本知代、*Trypanosoma congolense* EMF 虫体特異的表面蛋白 (CESP) の多型解析、第 17 回分子寄生虫ワークショップ、2009 年 8 月 6 日～9 日、群馬
7. 菅沼啓輔、*Trypanosoma congolense* (Tc) のツェツェ体内における CESP 発現パターンの解析、第 17 回分子寄生虫ワークショップ、2009 年 8 月 6 日～9 日、群馬
8. 竹本知代、*Trypanosoma congolense* CESP の多型解析、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 25 日～27 日、鳥取
9. 菅沼啓輔、*Trypanosoma congolense* (Tc) のツェツェバエ体内における CESP 発現パターンの解析、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 25 日～27 日、鳥取

[図書] (計 2 件)

1. 井上昇 (分担執筆)、医薬ジャーナル社、改訂版人獣共通感染症、2011 年、p390-400
2. 井上昇 (分担執筆)、近代出版、動物の感染症第三版、2011 年、p144

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 昇 (INOUE NOBORU)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号：10271751

(2) 研究分担者

河津 信一郎 (KAWAZU SHIN-ICHIRO)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号：60312295

後藤 康之 (GOTO YASUYUKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：50553434

(3) 連携研究者

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

渡辺 純一 (WATANABE JYUNICHI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：20201189

倉田 祥一朗 (KURATA SHOUICHIRO)
東北大学・薬学研究科・教授
研究者番号：90221944