

機関番号：12601  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：平成21年度～平成22年度  
 課題番号：21880007  
 研究課題名（和文）網羅的 TR 抗原探索法の応用によるトリパノソーマ症簡易血清診断法開発に関する研究  
 研究課題名（英文）Serological characterizations of tandem repeat proteins for detection of African trypanosome infection  
 研究代表者  
 後藤 康之（GOTO YASUYUKI）  
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
 研究者番号：50553434

研究成果の概要（和文）：アフリカトリパノソーマ症の診断法として血清学的診断が有望視されているが、現在使用されている原虫粗抗原はその特異性および安定供給性が問題である。本研究では、新規原虫特異的抗原の同定を目的として繰返し配列（TR）を持つタンパクの探索を行った。同定された TR タンパクの多くが抗原性を有しており、そのうち Tbg4 はウシ血清を用いた試験において 89% の感度と 100% の特異性を示した。今後は同抗原を用いたアフリカトリパノソーマ症診断テストの臨床開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Serological diagnosis is a useful method to detect African trypanosome infection. Currently available serological tests utilize whole parasites or crude antigens. Recombinant antigens may not only enhance test specificity by allowing the detection of species-specific antibodies, but could also improve reproducibility/standardization and reduce production costs. With a goal of identifying such recombinant proteins, we computationally identified proteins with tandem repeat (TR) domain from the parasite proteomes, expressed them and evaluated their potential for serological diagnosis of African trypanosome infections in cattle. Among those tested, Tbg4 demonstrated the best performance with 89% sensitivity and 100% specificity. Our data indicate the potential of these defined antigens for detection of animal African trypanosomiasis.

#### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,150,000	345,000	1,495,000
平成22年度	870,000	261,000	1,131,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,020,000	606,000	2,626,000

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：トリパノソーマ症、血清学的診断、抗原、タンデムリピート

#### 1. 研究開始当初の背景

人獣共通感染症としてヒトと家畜に多大な被害を与えているアフリカトリパノソーマ症の確定診断はいまだ顕微鏡検査による原虫直接検出に依存している。しかし検出感度は低く、検査に要する時間と労力も無視で

きない。原虫の直接検出にとってかわる簡易診断法として血清学的診断が注目されているが、現在利用可能なものは原虫粗抗原を使用しているため特異性と安定供給性に問題がある。したがって、より特異性の高い原虫抗原の同定が必須である。原虫抗原の探索に

は、感染個体血清を用いた原虫遺伝子発現ライブラリのスクリーニングが最も一般的に行われてきた。しかしながら、過去数十年に渡って行われたにもかかわらず、同定された抗原の数は限られており、また多くの抗原が特異性を欠くといった欠点を露呈していた。

従来の手法にとってかわるものとして、近年ゲノム情報を利用したバイオインフォマティクス手法に注目が集まっている。1995年にインフルエンザ菌ゲノム配列が報告されたのを皮切りに、バクテリアから哺乳類に至るまで幅広い生物においてゲノム配列の解析が行われている。寄生虫においてもマラリア原虫をはじめ病原種を中心に多種にわたりゲノム配列の決定がされてきた。ゲノム情報の有効利用を目指したバイオインフォマティクス分野においては、薬剤開発において既に有効利用されている一方、ワクチンや診断技術開発へのバイオインフォマティクスの利用となると遅々として進んでいなかった。抗原探索を目的としてこれまでに試されたバイオインフォマティクス手法はシグナル配列または膜貫通領域をもつタンパクの探索であった。これは分泌タンパクまたは細胞表面に発現したタンパクは抗原性が高いという知見に基づいている。しかしながら、例えばプロテオームに占めるシグナル配列をもつタンパクの割合は～20%と高く、バクテリアなどゲノムサイズが比較的小さい病原体には有効ではあるが、ゲノムサイズが大きい病原体（原虫等）では候補分子の絞り込みが困難である。実際トリパノソーマ原虫 *Trypanosoma brucei* ではシグナル配列をもつと予測されるタンパクが1,890にもものぼる。

アミノ酸の繰返し配列をもつタンパク質、Tandem Repeat (TR) タンパクはバクテリアからヒトまで多くの生物に見られる。過去に数々の病原体から同定された抗原の多くがTRドメインを持っており、そのことからTRタンパクは概して免疫原性が高いと考えられていたが、これまでに体系的な研究は行われていなかった。研究代表者はこのことに注目して、病原体ゲノムからTRタンパクをコードする遺伝子を探索することで免疫原性の高い新規抗原を同定できると考え、これまでに原虫のうち内臓型リーシュマニア症を引き起こす *Leishmania infantum*、およびシャーガス病を引き起こす *Trypanosoma cruzi* を用いて解析を行った。DNA配列中のTRドメイン探索を行うコンピュータプログラム Tandem Repeats Finder (TRF: Benson G, Boston University) を使用してそれら原虫の総遺伝子を解析したところ、全遺伝子中の1%前後がTRドメインを含むことがわかった。また新規に同定されたTRタンパクのほとんどが強い抗原性を有することが確認された。過去にさまざまな病原種から抗原性の

高いTRタンパクが同定されていることから、TRタンパクはそのユニークな構造が免疫原性に貢献していると考えられた。

## 2. 研究の目的

病原体からの血清診断用抗原同定へのバイオインフォマティクス手法としては、研究代表者らの報告が世界初の成功例である。これまでに2種のトリパノソーマ科原虫感染症（リーシュマニア症、シャーガス病）によってその有用性が証明されたが、本研究ではアフリカトリパノソーマ症に本手法を応用することにより、血清学的診断に有用な新規診断用抗原を同定することを目的とした。また、アフリカトリパノソーマ原虫のTR遺伝子群を近縁の原虫種と比較することにより、当該原虫におけるTR遺伝子群の獲得の経緯を探ることも行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、研究代表者が開発したTRタンパク検索手法が、アフリカトリパノソーマ原虫からの抗原同定にも有用であるかを実験的に証明するため、(1)TRを主としたトリパノソーマ原虫ゲノムの解析、(2)TRタンパク上位候補の大腸菌組換え体の作製、(3)ELISAによるそれら候補タンパクの抗原性試験を行った。

### (1) 原虫ゲノムからのTR遺伝子の探索

アフリカトリパノソーマ症の原因原虫のうち、ゲノム情報が得られる種についてTR探索を含めた解析を行った。原虫種としては、家畜動物であるウシ、ウマ等に感染性を示す *T. brucei brucei* および *T. congolense*、そしてヒトに睡眠病を引き起こす *T. brucei gambiense* を選択した。データベースより得られた各原虫種のゲノム情報をTRFプログラムで解析して、TR遺伝子を同定した。同時にTRドメインの性状（1リピートユニットの大きさ、リピートのコピー数）を解析した。また、TR以外のパラメータについてもシグナル配列、膜貫通領域、GPIアンカー領域の存在やmRNA、タンパク質の発現レベル、近縁種での保存性について解析を行った。

### (2) TRタンパク組換え体の作製

TRタンパクの多くは非常に大きな分子量（100kDa以上）を有し、ORF全体を大腸菌組換え体として発現するのは困難がともなったため、ここではORF全体でなくTRドメインのみを部分的に組換え体として作製することによって問題を克服した。TRドメインの一部のみをコードする遺伝子（～300bp）を合成技術によって作製し、発現ベクターpET28に組み込んだ。pET28プラスミドは大腸菌に導入後、His-tagタンパクとして

Ni-NTA Resin を用いて精製した。

### (3) 候補タンパクの抗原性試験

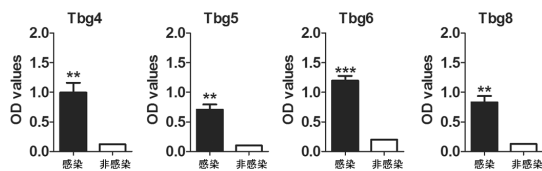
組換えタンパクについてその抗原性を実験感染マウス由来血清および自然感染牛由来血清を用いて試験した。ウシ血清試料は過去に研究協力者である帯広畜産大学・井上昇准教授がザンビアでのフィールド調査の際に採取したものをを用いた。試験におけるコントロールとして日本ウシ血清を使用した。96 穴イムプレートに抗原希釈液 (200ng/ウェル) で処理し、200 倍希釈血清およびプロテイン G をそれぞれ一次抗体、二次抗体として反応を行った。それぞれのタンパクについてトリパノソーマ症群および対照群の反応性 (OD 値) を統計学的に比較すると同時に、対照群の OD 値の平均値 + 3 SD をカットオフ値として試験の感度および特異性を算出した。

## 4. 研究成果

### (1) トリパノソーマ原虫の TR 遺伝子群

*T. b. brucei* のタンパク質をコードする 8,898 の遺伝子について解析を行ったところ、83 (0.93%) が TR 遺伝子であることが明らかになった。この TR 遺伝子の頻度は他の原虫種や生物種と比較しても高いものではなかった。その一方で、アフリカトリパノソーマ原虫ではこれら TR 遺伝子のうち非常に大きいリピート領域を有するものの割合が高く、このことはトリパノソーマ科原虫に特徴的であることが分かった。*T. b. gambiense* や *T. congolense* といった他のアフリカトリパノソーマ原虫でも同様のパターンが観察された。

次に、これら TR タンパクが他の原虫種で確認されたのと同様にアフリカトリパノソーマ原虫でも同様に高い抗原性を持っているのか調べるために、大腸菌組換え体を作製し原虫感染マウス血清を用いて試験した。以下の図で示す通り、これら TR タンパクは非感染マウス由来血清と比較して感染マウス血清に対して有意に高い反応性を示すことが明らかになった。



以上のようにリーシュマニア原虫やクルーズトリパノソーマ原虫といった他のトリパノソーマ科原虫と同様にアフリカトリパノソーマ原虫においても抗原性の高い TR タンパク質が存在することが明らかになった。しかしながら、下図で示す通り同じトリパノソーマ科に属する原虫であってもその宿主適応の様式は大きく異なっていることが分

かっている。眠り病を引き起こす *T. brucei* は細胞外寄生体でありその感染防御に液性免疫が関与しているのに対して、マクロファージ内寄生体のリーシュマニア原虫にとって液性免疫はむしろ都合が良い。近年の比較ゲノム解析によりこの両者は高い相同性を持っており、種特異的遺伝子はそれぞれが異なる環境へ適応変化する過程で比較的新しく獲得されたものと考えられる。



	<i>T. brucei</i>	<i>Leishmania spp.</i>
疾患名	眠り病	リーシュマニア症
相同性	~80%	
寄生環境	細胞外	マクロファージ内
抗体の機能	感染抵抗的	感染増悪的

そこで個々の TR 遺伝子がトリパノソーマ科原虫で保存されているのかそれとも独自に獲得してきたものかを明らかにするため、それら TR 遺伝子の保存性について解析を行った。その結果、TR 遺伝子の頻度やリピート領域の大きいことといった共通点にも関わらず、大多数が種特異的であった。また、リーシュマニア原虫 TR 蛋白の多くが細胞表面シグナルを有するのに対して *T. brucei* の TR 蛋白は細胞内に局在することがあきらかになり (下表)、液性免疫が TR 蛋白の選択に影響することが示唆された。

	<i>T. b. brucei</i>		<i>L. major</i>	
Total	83	(%)	59	(%)
Signal sequence (SP)	10	(12.0)	17	(28.8)
Trans-membrane domain (TM)	6	(7.2)	17	(28.8)
C-term GPI signal	4	(4.8)	8	(13.6)
SP & TM	2	(2.4)	15	(25.4)
SP & C-term GPI signal	1	(1.2)	7	(11.9)

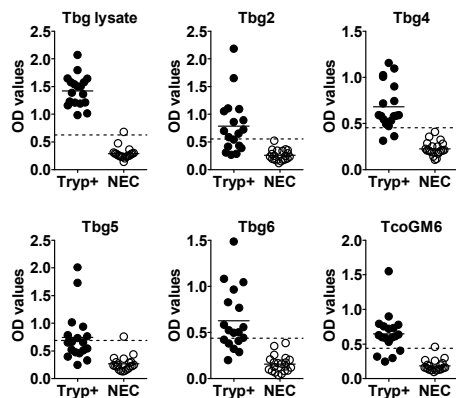
1 本の鞭毛を持つ原生生物からなる分類群であるトリパノソーマ科に属する原虫は、比較的近い共通の祖先を持つことから形態学的特徴を含め様々な共通点がある一方、その感染によって引き起こされる病態および宿主免疫回避機構は全く異なる。本研究で得られた知見は、TR タンパクが gene duplication という極めて普遍的でシンプルな現象によって生み出されながらも、生活環・寄生部位・病態・宿主免疫応答の異なる原虫においてその進化の過程で取捨選択が行われてきたことを示唆している。今後、TR タンパクが強い抗体反応を引き起こす仕組みを明らかにするとともに、個々の原虫における液性免

疫の役割と TR タンパクのパターンとを網羅的に比較解析することにより、病原体において gene duplication が免疫学的役割を通じて宿主環境適応に貢献しているという新しい知見につながると考えられる。

これら研究成果は 5. 主な発表論文等に示してある論文 1 報および学会発表 2 件として公表済みである。

## (2) TR 抗原の臨床応用

本研究を通して作製したアフリカトリパノソーマ原虫 TR タンパクがマウス実験感染モデルにおいて高い抗原性を持つことが確認されたため、次に臨床応用を目的としてウシ血清を用いた試験を行った。使用したウシ血清試料はザンビアにおいて寄生虫学的診断によりアフリカトリパノソーマ症(ナガナ病)と診断された個体より得られたものである。陰性コントロールとして日本で採取されたウシ血清(帯広畜産大学 横山直明准教授より提供)を用いて、陰性群 OD 値平均+3 SD をカットオフ値とした。結果、過去に未同定であり今回コンピュータ探索によって初めて同定された TR 抗原の多くが高い感度を有することが確認された(下図)。その中でも Tbg4 は感度(89%)、特異性(100%)が最も高かった。



以上の結果から、TR 抗原がアフリカトリパノソーマ症血清学的診断の臨床開発において有用であることが示唆された。しかしながら、最も有望な Tbg4 においても感度が 89% と改善の必要がある。だが、Tbg4 に対して抗体反応が観察されなかった個体において他の TR 抗原への抗体反応が観察されたという結果が得られている。このため、単独ではなく複数の TR 抗原を用いることによって感度・特異性ともに非常に高い診断技術の開発が可能であると考えられる。今後は抗原の組合せ(種類、個々のタンパク量)について検討を行う予定である。

これら TR 抗原の家畜動物への臨床応用に関する研究の成果については、現在 2 報の原

著論文を投稿中である。

## 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 1 件)

- ① Goto Y, Duthie MS, Kawazu SI, Inoue N, Carter D. 2011. Biased cellular locations of tandem repeat antigens in African trypanosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 405:434-438. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Goto Y, Carter D, Duthie MS, Matsumoto Y, Kawazu SI, Inoue N, Reed SG. Commonness and uniqueness of tandem repeat antigens in the trypanosomatid parasites. The 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases. 平成 23 年 1 月 10 日、国立感染症研究所
- ② 後藤 康之, Darrick Carter, 井上 昇, 河津 信一郎, Steven G. Reed. 原虫におけるタンデムリピート抗原の意義。第 79 回日本寄生虫学会大会、平成 22 年 5 月 20 日、旭川市大雪クリスタルホール。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 康之 (GOTO YASUYUKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号 : 50553434

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :