



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Study on the Developmental Stage-specific Cell Surface Protein of African Trypanosomes(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	山崎, 詩乃
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第475号
Issue Date	2017-03-13
Type	博士論文
Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56189

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本(国)籍)	山崎詩乃(広島県)		
主指導教員氏名	帯広畜産大学 教授 横山直明		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第475号		
学位授与年月日	平成29年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	Study on the Developmental Stage-specific Cell Surface Protein of African Trypanosomes (アフリカトリパノソーマ発育段階特異的細胞表面タンパク質に関する研究)		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	河津 信一郎
	副査	帯広畜産大学 教授	横山 直明
	副査	岩手大学 教授	板垣 匡
	副査	東京農工大学 准教授	古谷 哲也
	副査	岐阜大学 准教授	高島 康弘

学位論文の内容の要旨

アフリカトリパノソーマはツェツェバエによって媒介される住血性寄生原虫であり、アフリカトリパノソーマ症によりアフリカ諸国に多大な人的、経済的被害をもたらされている。しかしトリパノソーマが細胞表面抗原を高頻度かつランダムに変異させるため予防ワクチンの開発は成功しておらず、また現行の抗原虫薬には致命的な副作用や耐性原虫の出現等の問題があり、現在に至るまでアフリカトリパノソーマ症に対する安全で有効な予防・治療法は確立されていない。そこで新規制御法として、ツェツェバエ体内の抗原変異性を持たないトリパノソーマ発育ステージを標的とした伝播阻止ワクチンの有効性が期待されている。

本研究では、トリパノソーマがヘム生合成経路を欠損しているという点に着目し、アフリカトリパノソーマの一種である *Trypanosoma congolense* を用いて寄生環境中よりヘム源を取込むレセプターの同定、機能解析を行った。また同定されたレセプターの、伝播阻止ワクチンの標的としての可能性を評価した。

第一章ではヘムを取込むレセプターの候補として *T. congolense* haptoglobin hemoglobin complex receptor (TcHpHbR) を選択し、その性状及び機能を解析した。また *T. congolense* 全発育ステージにおけるヘム源の取込みを、蛍光色素標識タンパク質を用いて観察した。

TcHpHbR の発現解析を行った結果、TcHpHbR はツェツェバエ口吻部寄生ステージである epimastigote 型 (EMF) の細胞膜及び鞭毛ポケットに特異的に発現していることが明らかとなった。また、TcHpHbR とリガンドの分子間相互作用を解析した結果、TcHpHbR は遊離型ヘモグロビン (Hb) と特異的に結合し、解離定数が 20 nM と高い親和性を示した。一方でハプトグロビンヘモグロビン複合体 (HpHb) との親和性は、遊離型 Hb とのものに比較して

低いことが明らかになった。続いて *T. congolense* 全発育ステージにおける蛍光標識 Hb, 蛍光標識ハプトグロビン (Hp) 及び蛍光標識 HpHb の取込みを解析した。その結果, EMF において遊離型 Hb のみ取込みが観察された一方で血流型, procyclic 型, metacyclic 型では遊離型 Hb, 遊離型 Hp 及び HpHb のいずれの取込みも観察されなかった。

以上の結果から, TcHpHbR は EMF における遊離型 Hb のレセプターであることが強く示唆された。このことを踏まえ, TcHpHbR を *T. congolense* epimastigote specific hemoglobin receptor (TcEpHbR) と改名した。*T. congolense* と *T. brucei* がそれぞれ異なる発育ステージで異なる様式のへム源を取込む理由としては以下の仮説が考えられる。*T. congolense* と *T. brucei* は EMF の寄生部位が異なり, ツェツェバエ口吻部に寄生する *T. congolense* EMF はツェツェバエの吸血時に血液に曝露されるのに対し, 唾液腺に寄生する *T. brucei* EMF は血液に曝露される機会はない。そのため *T. congolense* EMF は吸血された血液に豊富に含まれる遊離型 Hb を取込み, *T. brucei* は血流型において HpHb を取込んでいる。*T. congolense* と *T. brucei* の共通祖先はツェツェバエ口吻部に寄生していたと考えられているため, 進化の過程で *T. brucei* が寄生部位を唾液腺に変えたことに伴い, そのへム源を取込む発育ステージやレセプターのリガンドが変わったと考えられた。

第二章では TcEpHbR の伝播阻止ワクチンの標的としての可能性を検証した。まず抗 TcEpHbR モノクローナル抗体 (mAb) を作製し, EMF 培養への mAb 添加による TcEpHbR の機能阻害を試みた。また Hb の除去培地における EMF の増殖及び形態的变化を解析した。

mAb を EMF に添加培養した結果, mAb 濃度依存的に増殖抑制及び細胞変性を引き起こした。この細胞変性を起こした EMF を透過型電子顕微鏡で観察した結果, 細胞質内に電子密度の薄い小胞が多数確認された。また EMF における Hb の取込みは mAb 存在下でも阻害されなかった。Hb 除去培地を作製し EMF を培養した結果, 細胞増殖は抑制されたが mAb 添加時のような顕著な形態変化は見られなかった。

第一章では TcEpHbR が遊離型 Hb の取込みに関与することが明らかになった。その一方で, mAb は遊離型 Hb の取込みを阻害することなく EMF に細胞変性を引き起こした。このことは, TcEpHbR が遊離型 Hb の取込みだけでなく取込んだ Hb の輸送, 代謝に関わっている可能性を示唆している。一方で単純に Hb を除去した培地では EMF に増殖抑制は見られたが細胞変性は確認されなかった。ツェツェバエの非吸血時には, EMF の寄生部位である口吻部の Hb 存在量が少なくなるため, EMF はそのような低 Hb 条件下に適応した機構を備えていると予想された。よって Hb 除去培地における EMF の増殖抑制は Hb 飢餓に対する生理的な反応であった可能性が高い。また mAb を添加培養した EMF で観察されたような電子密度の低い小胞は, 細胞内へム濃度の制御に関与する遺伝子のノックアウトによっても観察されることが報告されている。このことから mAb による細胞変性を伴う EMF の増殖抑制は, mAb が Hb の細胞内輸送に干渉した結果, 細胞内へムの恒常性が破綻したことが原因である可能性が示唆された。

本研究により, *T. congolense* がツェツェバエ口吻部で Hb を取込むレセプター TcEpHbR が新規に同定され, さらに TcEpHbR に対する抗体によって EMF の増殖は抑制されることが明らかになった。このことから TcEpHbR はツェツェバエ内で EMF を抑制する伝達阻止ワクチンの標的として有効である可能性が示された。しかしその一方で, その細胞変性・増殖抑制の機構は不明である。今後は mAb による細胞変性, 増殖抑制機構の詳細を解明し, 将来的な新規トリパノソーマ制御法開発に寄与することが期待される。

審査結果の要旨

アフリカトリパノソーマはツェツェバエによって媒介される住血性寄生原虫である。ア

フリカトリパノソーマ症によりアフリカ諸国に多大な人的、経済的被害をもたらされている。しかし現在に至るまで本症に対する安全で有効な予防・治療法は確立されていない。そこで新規制御法としてツェツェバエ体内の抗原変異性を持たないトリパノソーマを標的とした、伝播阻止ワクチンの有効性が期待されている。

本研究では、トリパノソーマがヘム生合成経路を欠損しているという点に着目し、フリカトリパノソーマの一種である *Trypanosoma congolense* を用いて寄生環境中よりヘム源を取込むレセプターの同定、機能解析を実施した。また同定されたレセプターの、伝播阻止ワクチンの標的としての可能性を評価した。

第一章ではヘム源取込みレセプターの候補として *T. congolense* haptoglobin hemoglobin complex receptor (TcHpHbR) が選択され、その性状及び機能解析が実施された。また *T. congolense* 全発育ステージにおけるヘム源の取込みを、蛍光色素標識タンパク質を用いて観察した。

TcHpHbR の発現解析により、TcHpHbR はツェツェバエ口吻部寄生ステージである epimastigote 型 (EMF) の細胞膜及び鞭毛ポケットに発現していることが明らかにされた。また、TcHpHbR とリガンドの分子間相互作用を解析した結果、TcHpHbR は遊離型ヘモグロビン (Hb) と特異的な結合を示した。続いて *T. congolense* 全発育ステージにおける蛍光標識タンパク質の取込みを解析した結果、EMF では遊離型 Hb のみ取込みが観察された。

以上の結果から、TcHpHbR は EMF における遊離型 Hb のレセプターであることが強く示唆された。このことを踏まえ、TcHpHbR は *T. congolense* epimastigote specific hemoglobin receptor (TcEpHbR) と改名された。

第二章では TcEpHbR の伝播阻止ワクチンの標的としての可能性の検証が実施された。抗 TcEpHbR モノクローナル抗体 (mAb) を作製し、EMF 培養への mAb 添加による TcEpHbR の機能阻害、及び Hb の除去培地における EMF の増殖及び形態的变化が解析された。

mAb を添加培養した EMF では、mAb 濃度依存的に増殖抑制及び細胞変性が観察された。また変性細胞質内に電子密度の薄い小胞が多数確認された。この mAb は EMF における Hb の取込みを阻害しなかった。Hb 除去培地を作製し、EMF を培養したところ、細胞増殖は抑制されたが mAb 添加時のような顕著な形態変化は見られないことが明らかになった。

mAb が遊離型 Hb の取込みを阻害することなく EMF に細胞変性を引き起こしたことから、TcEpHbR は取込んだ Hb の代謝にも関わっている可能性が示唆された。一方で Hb 除去培地における EMF の増殖抑制は Hb 飢餓に対する生理的な反応であった可能性が高いと考えられた。このことから mAb による細胞変性を伴う EMF の増殖抑制は、mAb が TcEpHbR の未知の機能や Hb の細胞内輸送に干渉した結果、細胞内ヘムの恒常性が破綻したことが原因である可能性が示唆された。

本研究により、*T. congolense* の Hb 取込みレセプター TcEpHbR が新規に同定され、さらに TcEpHbR に対する抗体によって EMF の増殖は抑制されることが示された。このことから TcEpHbR は伝達阻止ワクチンの標的として有効である可能性が示された。一方でその細胞変性・増殖抑制の機構は不明である。今後は mAb による細胞変性・増殖抑制機構の詳細を解明し、将来的な新規トリパノソーマ制御法開発に寄与することが期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Characterization of an epimastigote-stage-specific hemoglobin receptor of *Trypanosoma congolense*

著者名 : Yamasaki, S., Suganuma, K., Yamagishi, J., Asada, M., Yokoyama, N., Kawazu, S. and Inoue, N.

学術雑誌名 : Parasites & Vectors

巻・号・頁・発行年 : 9 (1) : 299, 2016

既発表学術論文

1) 題目 : Adenosine-uridine-rich element is one of the required *cis*-elements for epimastigote form stage-specific gene expression of the *congolense* epimastigote specific protein

著者名 : Suganuma, K., Mochabo, K. M., Hakimi, H., Yamasaki, S., Yamagishi, J., Asada, M., Kawazu, S. and Inoue, N.

学術雑誌名 : Molecular & Biochemical Parasitology

巻・号・頁・発行年 : 191 (1) : 36-43, 2013

2) 題目 : Identification and characterization of a *Trypanosoma congolense* 46 kDa protein as a candidate serodiagnostic antigen

著者名 : Zhou, M., Suganuma, K., Ruttayaporn, N., Nguyen, T. T., Yamasaki, S., Igarashi, I., Kawazu, S., Suzuki, Y. and Inoue, N.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 76 (6) : 799-806, 2014

3) 題目 : Isolation, cultivation and molecular characterization of a new *Trypanosoma equiperdum* strain in Mongolia

著者名 : Suganuma, K., Narantsatsral, S., Battur, B., Yamasaki, S., Otgonsuren, D., Musinguzi, S. P., Davaasuren, B., Battsetseg, B. and Inoue, N.

学術雑誌名 : Parasites & Vectors

巻・号・頁・発行年 : 9 (1) : 481, 2016