

学位論文の要旨

学位の種類	医学博士	氏名	馬木提 吾拉木
<h3>学位論文題目</h3>			
<p><i>Echinococcus multilocularis</i>: Developmental stage-specific expression of Antigen B 8-kDa subunits 「多包条虫:発育段階特異的な Antigen B 8kDa サブユニットの発現について」</p>			
<h3>共著者名</h3>			
迫 康仁、肖 寧、中谷 和宏、中尾 稔、山崎 浩、Marshall W. Lightowlers、Philip S. Craig、伊藤亮			
<h3>未公表</h3>			
<h3>研究目的</h3>			
<p>多包虫症は、多包条虫の幼虫段階である包虫の寄生に起因する疾患である。ヒトへの感染は、多包条虫の虫卵(六鉤幼虫)を偶発的に経口摂取することにより成立する。六鉤幼虫は各組織に生着し、嚢胞を形成する。その後、嚢胞内に繁殖胞が形成され、その内部に原頭節が形成される。この発育段階で、多包虫は無性生殖的に小嚢胞を形成しながら増殖(腫瘍様病変)し、各器官の機能障害を引き起こす。原頭節は終宿主の小腸内で翻転後、腸粘膜へ固着し成虫となる。</p> <p>Antigen B (AgB) は、多包虫の近縁種である単包虫の包虫液で同定された蛋白質であり、分子量160kの熱抵抗性リポ蛋白質である。AgBは、SDS-PAGEにて分子サイズ8kDaの整数倍のラダーとして検出され、高分子サブユニットは8kDa サブユニットで構成されている。現在までに4種の単包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子が単離されている。AgB は、包虫液を構成する主要な分泌蛋白質であることより、寄生虫の生理機能に重要な役割を果していると考えられている。また、AgB は、好中球の遊走を阻害し、非感染防御反応である Th2 細胞の活性化を誘発することが明らかとなっている。以前我々は、多包虫 AgB 8kDa サブユニット遺伝子を単離し、その抗原性の解析を行った。しかしながら、単包虫で報告されているように、他の AgB 8kDa サブユニット遺伝子が存在するか否か、あるいは AgB 8kDa サブユニット遺伝子が寄生虫の発育に伴う制御を受けているか明らかとなっていない。そこで、本研究では(1)新規の AgB 8kDa サブユニット遺伝子を単離し、(2)寄生虫の発育に伴う発現パターンの解析を行った。</p>			
<h3>材料・方法</h3>			
<p>多包虫嚢胞および原頭節は、マウスの腹腔内で継代維持している多包虫より調製した。未成熟成虫は、多包虫を経口的に感染させたイヌの小腸より調製した。嚢胞、原頭節および未成熟成虫より抽出したトータル RNA に逆転写反応を施した一本鎖 cDNA を鋳型として、3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)法および 5'-RACE 法を行うことにより、多包虫 AgB 8-kDa サブユニット cDNA を単離した。組換え多包虫 AgB 8kDa サブユニットは、大腸菌発現系を用いて調製した。各多包虫 AgB 8kDa サブユニットに対する抗体は、ウサギ(日本白色種)を組換え蛋白質で免疫することにより調製した。多包虫嚢胞、原頭節および未成熟成虫における多包虫 AgB 8-kDa サブユニットの発現パターンは、各多包虫 AgB 8-kDa サブユニットに特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法および単一特異的抗体を用いたイムノブロット法により解析した。</p>			

成 績

1. 多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子の単離

本研究において、5種類の多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子を単離した。1つは以前 EmAgB 8/1として報告したものと同一であり、他は新規の多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子であった。新規多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子の内、3つは単包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子に高い同一性(90-94%)を示していた。したがって、これらの遺伝子をそれぞれ、EmAgB 8/2、EmAgB 8/3 および EmAgB 8/4 と名付けた。残る1つは、多包虫および単包虫 AgB 遺伝子に類似性を示し且つ他の遺伝子と相同性を示さないため、AgB 遺伝子ファミリーの1つと考えられ、EmAgB 8/5 と名付けた。得られた cDNA より予測されるアミノ酸配列を比較したところ、45番目から52番目のアミノ酸残基(EmAgB 8/1 のアミノ酸番号)は高度に保存されていた。

2. 多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子の各発育段階における転写産物の解析

各多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子特異的なプライマーを用いた RT-PCR を嚢胞、原頭節および成熟成虫に対して行った。本実験では、内部コントロールとして多包虫サイクロフィリン遺伝子を用いた。その結果、多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子が各発育段階において差次的に転写されていることが明らかとなった。嚢胞においては、EmAgB 8/1 が最も強く発現しており、ついで EmAgB 8/2、EmAgB 8/3 および EmAgB 8/4 が同レベルで発現していた。また、EmAgB 8/5 の PCR 産物は検出されなかった。原頭節においては、EmAgB 8/1 および EmAgB 8/3 が最も強く発現しており、ついで EmAgB 8/2 および EmAgB 8/4 が発現していた。また、EmAgB 8/5 の PCR 産物は僅かに検出された。未成熟成虫においては、EmAgB 8/3 が最も強く発現しており、ついで EmAgB 8/5、EmAgB 8/1 および EmAgB 8/4 の順で発現していた。また、EmAgB 8/2 の PCR 産物は検出されなかった。

3. 多包虫 AgB 8-kDa サブユニットの各発育段階における蛋白質レベルでの発現

嚢胞、原頭節および未成熟成虫における各多包虫 AgB 8-kDa サブユニットの蛋白質レベルの発現を解析するために、各多包虫 AgB 8-kDa サブユニットに単一特異的な抗体を用いてイムノブロット解析を行った。その結果、嚢胞および原頭節においては EmAgB 8/1、EmAgB 8/2、EmAgB 8/3 および EmAgB 8/4 が分子サイズ約 8 kDa のバンドとして検出された。未成熟成虫においては、EmAgB 8/3 のみが分子サイズ約 8 kDa および 16 kDa の2本のバンドとして検出された。EmAgB 8/5 に関しては、イムノブロット解析に用いた発育段階では検出されなかった。

考 案

本研究では、5種類の多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子を単離した。この結果より、多包虫 AgB 8-kDa サブユニットは多重遺伝子であり、少なくとも5種類の遺伝子で構成されていることが明らかとなった。

AgB 8-kDa サブユニット特異的プライマーを用いた RT-PCR から、AgB 8-kDa サブユニット遺伝子が寄生虫の発育段階により、正あるいは負の制御を受けていることが明らかとなった。つまり、EmAgB 8/1、EmAgB 8/2 および EmAgB 8/4 は嚢胞から未成熟成虫へ発育するに従いそれらの転写レベルは減少し、逆に EmAgB 8/5 の転写レベルは増加していた。また、EmAgB 8/3 については、全ての発育段階で構成的に転写されていることが明らかとなった。蛋白質レベルでは、EmAgB 8/1、EmAgB 8/2 および EmAgB 8/4 は、嚢胞および原頭節のみで検出され、EmAgB 8/3 は全ての発育段階で検出された。また、EmAgB 8/5 に関しては本研究に用いた発育段階の寄生虫組織では検出されなかった。転写レベルで検出されたにも関わらず、蛋白質レベルで検出できなかった要因として、RT-PCR とイムノブロット法の感度が考えられる。また、多包虫 AgB 遺伝子が転写後の過程において何らかの制御を受けている可能性も考えられる。さらに、EmAgB 8/5 においては、寄生虫の発育に伴いその転写レベルが増加していることより、成熟成虫において蛋白質レベルでの検出の可能性が推察されるが、その材料を得ることが困難なため成熟成虫を用いることが出来なかった。今後、成熟成虫を用いた詳細な解析が必要であると思われる。EmAgB 8/3 は、全発育段階で寄生虫の生物活性に重要な機能を有していることが示唆され、EmAgB 8/1、EmAgB 8/2 および EmAgB 8/4 は中間宿主での生存に重要な機能を有していることが示唆された。

AgB は、その一次構造の相同性より、拡張条虫および縮小条虫で報告されている α -ヘリックス構造に富んだ疎水性結合基結合蛋白質(HLBP)と考えられる。この HLBP の内いくつかは、その脂肪酸結合活性により、脂質の下

毒、輸送および代謝に関与していることが明らかとなっている。最近、単包虫 AgB は拡張条虫および縮小条虫 HLBP とは異なる疎水性結合基結合活性を有していることが報告された。拡張条虫および縮小条虫の HLBP は細胞内蛋白質であるのに対し、AgB は分泌蛋白質である。このような蛋白質の局在や結合活性の違いより、AgB が細胞内脂肪酸交換を介した脂肪酸の代謝へ関与しているのではなく、他の機能を発揮することにより寄生虫の宿主内環境での生存に関与していることが示唆されている。多包虫 AgB では、脂肪酸結合活性等の生物活性に関する知見がない。多包虫 AgB が、寄生虫の発育に伴い制御を受けているという結果は、寄生虫の生存戦略で異なる機能を有していることに関連していると示唆される。

結 論

多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子は多重遺伝子であり、少なくとも 5 種類存在することを明らかにした。また、多包虫 AgB 8-kDa サブユニット遺伝子が、寄生虫の発育に伴い差次的に発現していることを初めて明らかにした。これらの結果は、寄生虫-宿主相互作用における AgB 8-kDa サブユニットの生物活性を解明する糸口を提供すると考えられる。

引 用 文 献

1. Chemale G., Haag K.L., Ferreira H.B. and Zaha A. (2001) *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. Mol. Biochem. Parasitol. 116, 233-237.
2. Arend A.C., Zaha A., Ayala F.J. and Haag K.L. (2004). The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. Exp. Parasitol. 108, 76-80.
3. Ito A and Craig P.S. (2003) Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections. Trends Parasitol. 19, 377-381.

参 考 論 文

1. Mamuti W., Yamasaki H., Sako Y., Nakao M., Xiao N., Nakaya K., Sato N., Vuitton D.A., Piarroux R., Lightowlers M.W., Craig P.S. and Ito A. (2004). Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from *Echinococcus multilocularis*. J. Clin. Microbiol. 42, 1082-1088.
2. Mamuti W., Yamasaki H., Sako Y., Nakaya K., Nakao M., Lightowlers M.W., Ito A. (2002) Usefulness of hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* developed in mice with secondary infection for serodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. Clin. Diag. Lab. Immunol. 9, 573-576.
3. Mamuti W., Sako Y., Nakao M., Xiao N., Nakaya K., Ishikawa Y., Yamasaki H., Lightowlers M.W., Ito A. (2006). Recent advances in characterization of *echinococcus* antigen B. Parasitol. Int. 55 (in press).
4. Xiao N., Mamuti W., Yamasaki H., Sako Y., Nakao M., Nakaya K., Gottstein B., Schantz P.M., Lightowlers M.W., Craig P.S. and Ito A. (2003) Evaluation of use of recombinant Em18 and affinity-purified Em18 for serological differentiation of alveolar echinococcosis from cystic echinococcosis and other parasitic infections. J. Clin. Microbiol. 41, 3351-3353.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	馬 木 提 吾 拉 木
<p>審査委員長 伊 藤 喜 久 ㊦</p> <p>審査委員 鈴 木 裕 ㊦</p> <p>審査委員 伊 藤 亮 ㊦</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><i>Echinococcus multilocularis</i> : Developmental Stage-specific Expression of Antigen B 8-kDasubunits</p> <p>(多包条虫 : 発育段階特異的な Antigen B 8 kDa サブユニットの発現について)</p>			
<p>多包条虫 (<i>Echinococcus multilocularis</i>) はヒト、げっ歯類を中間宿主、イヌ科動物を終末宿主とする寄生虫疾患である。</p> <p>申請者は、単包条虫由来の耐熱性リポ蛋白サブユニット Antigen B 8kDa (AgB) に相当する蛋白遺伝子を多包条虫から初めて単離し、発育段階、すなわち嚢包、原結節、未成熟成虫における発現プロファイルを遺伝子学的、免疫化学的に解析した。</p> <p>嚢包、原結節は継代マウスより、未成熟成虫は感染犬小腸から得て、cDNA を作製、3'-RACE, 5'-RACE によりサブユニット遺伝子の塩基配列を決定し、大腸菌に発現させ、組み替え体および、これに対するウサギ抗体を作製した。</p>			

この結果5種類のサブユニット遺伝子が単離され、EmAgB8/1-5と命名した。EmAgB8/1は単包条虫とほぼ同一構造、EmAgB8/2-4は90-94%の相同性を示した。これに対してEmAgB8/5は51-58%と相同性は低く、cDNAから予測されるアミノ酸配列では45番目から52番目で全てのサブユニットで高度の保存されており、EmAgB8/5同一サブユニット遺伝子ファミリーと判断された。

RT-PCR法による解析では、嚢包においてEmAgB8/1がもっとも高度に、EmAgB8/2-4の転写発現が見られ、EmAgB8/5は認められなかった。一方、原頭節ではEmAgB8/1、EmAgB8/3が、これに次いでEmAgB8/2、EmAgB8/4が発現し、ごくわずかであるがEmAgB8/5も認められた。一方未成熟成虫では、EmAgB8/5が高度に発現し、EmAgB8/2の発現は認められなかった。EmAgB8/3は全ての段階で発現を示した。

ウェスタンブロットの蛋白発現解析では、特異抗体に反応して8kDaのバンドが認められ、転写発現とほぼ一致する結果を得た。しかし、未成熟成虫ではEmAgB8/5抗原は同定されなかった。

申請者は多包条虫のAgB 8kDaサブユニット遺伝子を、5種類単離した。このうち4種類は新規遺伝子であった。それぞれが発達過程で出現、消長し複雑な組み合わせで高分子化し構造多様性の高い分泌蛋白として存在することを遺伝子発現、蛋白発現により世界で初めて示した意義は高い。申請者は本研究により完全配列cDNA、対応する遺伝子産物、およびその特異抗体を得ており、今後多包条虫の蛋白構造特性との関連性から、蛋白機能、生体寄生の機序の解明、ヒト、動物における病態診断への応用展開など基礎から臨床応用まで広い領域において、更なる研究の進展が大いに期待される。

申請者に対して本論文、および関連領域の試問に対して適切かつ明確な応答が得られたことから、本論文は医学博士の学位取得に値すると全員一致で判断した。

なお、本論文はExperimental Parasitologyに採択、印刷中である。審査に当たってレフリーからも高い評価が寄せられている。