

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	迫 康仁
<p>学位論文題目</p> <p><i>Echinococcus multilocularis</i>: Identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode (多包条虫: 幼虫ステージで発現しているカテプシンB様ペプチダーゼの同定と機能解析)</p> <p>共著者名 中谷和宏、伊藤 亮</p> <p>Experimental Parasitology 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>多包虫症は、多包条虫の幼虫の寄生に起因する疾患であり、新興・再興感染症として重要である。ヒトは多包条虫の虫卵を経口摂取することにより感染する。感染した幼虫は主に肝臓に定着した後、腫瘍様に増殖し致死的な肝機能障害を引き起こす。根治的な治療は外科的に病巣を完全に摘出すること以外無く、術後や手術が不可能な場合は多包虫の増殖抑制作用があるベンジミダゾール系製剤を用いた化学療法が適用されるが、その効果は不安定である。したがって、殺寄生虫効果を持つ薬剤の開発が急務となっている。</p> <p>寄生体のシステインペプチダーゼは、細胞内での蛋白質代謝に関与するのみならず宿主免疫回避機構や宿主内への侵入などに関与していることより、薬剤の標的分子あるいはワクチンの候補抗原と考えられている。</p> <p>多包虫においても寄生虫由来のペプチダーゼが宿主免疫からの回避や栄養取り込みに重要な役割を果していると推察されるが、宿主組織内に浸潤しながら増殖する多包虫の材料を宿主細胞を除去しながら調製することが困難であるため、多包虫のペプチダーゼに関する研究はほとんど行われていない。近年、我々は分子生物学的手法を用いて多包虫のシステインペプチダーゼの解析を開始し、カテプシンL様ペプチダーゼ(EmCLP1、EmCLP2)の酵素学的性状の解析を行ってきた。本研究では、新たに同定した多包虫カテプシンB様ペプチダーゼの酵素学的性状を酵母を用いて発現させた組換え酵素を用いて解析した。</p> <p>材料・方法</p> <p>多包虫材料として重度複合免疫不全マウスの腹腔内で増殖させたものを使用した。多包虫を1% CHAP含有トリス緩衝液でホモジナイズした後遠心した上清を多包虫抽出蛋白質として、また、多包虫をRPMI-1640培養液にて12時間、37度・5%CO₂ 条件下で培養した後に得られた培養上清を分泌・排泄(ES)産物含有溶液として調製した。多包虫システインペプチダーゼは、多包虫cDNAを鋳型とし、システインペプチダーゼ活性部位に保存されているアミノ酸配列を基に設計した縮合プライマーを用いたPCR法およびRACE法によりクローニングした。イムノプロット解析および免疫組織染色には、大腸菌にて発現させた組換えカテプシンB様ペプチダーゼを免疫したマウスより調製したモノクローナル抗体を用いた。活性型組換え酵素の調製にはジスルフィド結合を介した正常な立体構造の構築が必要なため、酵母発現システムを用いた。組換え酵素の性状解析は、合成ペプチド基質およびイムノグロブリン、アルブミン、コラーゲン、フィブロネクチンなどの蛋白質基質を用いて行った。</p>			

成 績

5'および3'RACE法を用いて、多包虫cDNAより2種類のカテプシンB様ペプチダーゼの遺伝子(EmCBP1、EmCBP2)をクローニングした。EmCBP1は、351個のアミノ酸をコードしており、成熟型酵素の予測分子サイズは28.2kDaであった。また、EmCBP2は、338個のアミノ酸をコードしており、成熟型酵素の予測分子サイズは28.1kDaであった。両酵素共にカテプシンBに特異的な構造であるoccluding loopが保存されており、エクソペプチダーゼ活性に関与するヒスチジン残基も保存されていた。イムノブロット解析を行った結果、抗EmCBP1抗体では24.5および25.5kDaの蛋白質が、抗EmCBP2抗体では27.0および29.9kDaの蛋白質が、両蛋白質溶液中(多包虫抽出蛋白質およびES溶液)で検出された。免疫組織染色の結果、両酵素は多包虫の胚層、繁殖胞および原頭節で発現していることが明らかとなった。酵母を用いて活性型酵素を調製し、酵素性状解析を行った。合成ペプチド基質を用いた解析より、至適pHが酸性側であることが明らかとなった。また、カテプシンLおよびBの基質であるZ-Phe-Arg-MCAに対する加水分解活性は高いが、カテプシンB特異的基質であるZ-Arg-Arg-MCAに対する活性は低いこと、中性および弱アルカリ性で速やかな酵素の失活がおこること、ヒトIgG、血清アルブミン、I型およびIV型コラーゲン、およびフィブロネクチンを分解する活性を有していること、などが明らかとなった。

考 案

本研究では、多包虫で発現しているカテプシンB様ペプチダーゼ(EmCBP1、EmCBP2)を同定し、それらの性状解析を行った。RT-PCR解析および多包虫ゲノム解析データベースに対するホモロジーサーチ解析の結果、両遺伝子が多包虫由来のものであることが確認された。また、両酵素が中間宿主内の全発育ステージで発現していること、また、一部は寄生虫体外へ分泌されていることが明らかとなった。抗EmCBP1抗体で認識された蛋白質のサイズは予測サイズより小さかった。通常カテプシンBは非活性型の43kDaのプロフォームとして発現され、活性化に伴い31kDaの単鎖型あるいは25kDaと5kDaの二重鎖型となる。従って、抗EmCBP1抗体で認識された蛋白質は二重鎖型EmCBP1の重鎖由来である可能性が推察された。

次に、組換え酵素を用いて酵素学的性状を明らかにした。両酵素とも至適pHが酸性側であり、他のリソソーム内酵素のそれと類似していた。また、カテプシンLおよびBの基質であるZ-Phe-Arg-MCAに対する加水分解活性は高いが、カテプシンB特異的基質であるZ-Arg-Arg-MCAに対する活性は低いことが明らかとなった。両酵素の特徴として、S2サブサイト構成アミノ酸残基の一つである173番目(マウスカテプシンBのアミノ酸番号)のアミノ酸残基が、マウスやヒトなどのカテプシンBでは電荷を持たないアミノ酸であるのに対し、負に荷電しているアスパラギン酸であることが挙げられる。従って、このアミノ酸残基の荷電状態が基質特異性に関与している可能性が推察された。さらに、両酵素が酸性条件下で様々な蛋白質に対する分解活性を有していることより、両酵素がリソソーム内酵素として蛋白質の分解に関与していることが示唆された。また、両酵素の一部は寄生虫体外へ分泌され、かつ細胞外マトリックス蛋白質を分解する活性を有していたことより、両酵素が寄生虫の宿主組織内浸潤に関与している可能性が示唆された。両酵素の寄生虫-宿主相互関係における役割を理解するために、更なる解析、特に*in vivo*での解析が必要である。

結 論

多包虫で発現している2種類のカテプシンB様ペプチダーゼの遺伝子クローニングに成功した。両酵素とも、中間宿主内での全発育ステージで発現しており、一部は寄生虫体外へ分泌されることが明らかとなった。また、活性型組換え酵素の至適pHは酸性側にあり、様々な蛋白質を分解する活性を有していることが明らかとなった。本研究は多包虫の宿主内における生存や増殖・発育機構を解明するための重要な知見を提供した。




引用文献

1. Kern P. 2006. Medical treatment of echinococcosis under the guidance of Good Clinical Practice (GCP/ICH). *Parasitology International* 55 Suppl, S273-S282.
2. McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annual Review of Pathology* 1, 497-536.
3. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. 2003. Echinococcosis. *Lancet* 362, 1295-1304.

参考論文

1. Sako Y, Fukuda K, Kobayashi Y, Ito A. 2009. Development of an immunochromatographic test to detect antibodies against recombinant Em18 for diagnosis of alveolar echinococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 252-254.
2. Sako Y, Yamasaki H, Nakaya K, Nakao M, Ito A. 2007. Cloning and characterization of cathepsin L-like peptidases of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 154, 181-189.
3. Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Yamasaki H, Gottstein B, Lightowers MW, Schantz PM, Ito A. 2002. Alveolar echinococcosis: characterization of diagnostic antigen Em18 and serological evaluation of recombinant Em18. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2760-2765.
4. Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A. 2000. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4439-4444.

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	迫 康仁
審査委員長 鈴木 裕 			
審査委員 伊藤 喜久 			
審査委員 伊藤 亮 			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;"><i>Echinococcus multilocularis</i>: Identification and fundamental characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode</p> <p style="text-align: center;">（多包条虫：幼虫ステージで発現している カテプシン B 様ペプチダーゼの同定と機能解析）</p>			
<p>本研究では、多包条虫幼虫寄生におけるペプチダーゼの機能解明を目的として、多包条虫幼虫から2種類のカテプシン B 様ペプチダーゼ (EmCBP1、EmCBP2) の cDNA クローンを得て、さらに各組み換え体酵素を大腸菌および酵母に発現させ各構造特性と酵素特性を解明するとともに、各酵素のモノクローナル抗体を作製し免疫染色法により寄生虫における局在を解析した。その結果、次が明らかとなった。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 同定したカテプシン B 様ペプチダーゼ (EmCBP1、EmCBP2) についての RT-PCR 解析および多包条虫ゲノム解析データベースに対するホモロジーサーチ解析の結果、両遺伝子は多包虫由来であることを先ず確定した。両者の一次構造は約 60% の相同性を示し、ヒト、マウスのカテプシン B とともに極めて高い相同性を有した。 2. 両酵素にはシステインペプチダーゼとしての特性、すなわち触媒部位を形成しエクソペプチダーゼ活性に関与するシステイン、ヒスチジン、アスパラギンの各残基が保存され、触媒部位内のオキシアニオンホール の存在も推定さ 			

れた。またカテプシン B 特有の構造である occluding loop も保存されていた。

3. イムノブロット解析により、両酵素は中間宿主内の全発育ステージで発現しており、一部は寄生虫体外へ分泌されていることが明らかとなった。
4. 免疫組織染色の結果、両酵素は多包虫の胚層、繁殖胞および原頭節で発現していた。
5. EmCBP1 では糖鎖付加の構造と機能における重要性が示され、EmCBP2 では部分ペプチド除去による非活性型から活性型への変換が示された。
6. 両活性型酵素は酸性側に至適 pH を有し、中性および弱アルカリ性では速やかに失活した。
7. 人工基質を用いた解析により、寄生虫カテプシン B 様ペプチダーゼはヒトのカテプシン B とはかなり異なる基質特異性を有していることが解明され、その差異を与える触媒部位の残基も推定された。
8. 両活性型酵素は、ヒト IgG、血清アルブミン、I 型および IV 型コラーゲン、およびフィブロネクチンを分解した。

本論文のこれらの結果から、両酵素はリソソーム内酵素として酸性条件下で様々な蛋白質の分解とそれによる栄養素摂取に関与していることが示唆され、また、寄生虫体外へ分泌された両酵素は細胞外マトリックス蛋白質を分解して寄生虫の宿主組織内浸潤に関与している可能性が示唆された。両酵素の寄生虫-宿主相互関係における役割をさらに深く理解するためには *in vivo* での解析が必要であるが、本研究は多包虫の宿主内における浸潤・生存、増殖・発育の機序を解明するために必須の知見を与えたのみならず、殺寄生虫すなわち治療のための標的分子としての両酵素特性理解にとって基本的知見を提供した。

論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対しても論文提出者から適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものであると判定した。