

称号及び氏名	博士(獣医学) 松林 誠
学位授与の日付	平成21年8月31日
論文名	Characterization of apical complex antigens associated with the invasion of <i>Cryptosporidium</i> into host cells (宿主細胞侵入に関わる <i>Cryptosporidium</i> の apical complex 抗原の解析)
論文審査委員	主査 笹井 和美 副査 小崎 俊司 副査 児玉 洋

論文要旨

緒言

Cryptosporidium は世界的に広く分布するアピコンプレックス門に属する原虫であり、*Plasmodium*、*Toxoplasma*、*Theileria* および *Eimeria* が含まれる。ヒトや動物が *Cryptosporidium* に感染した場合、無症状または激しい水様下痢が主症状である。しかし、免疫不全状態の宿主や幼獣では難治性、再発性となり、致死性の下痢症を発症することがある。現在まで *Cryptosporidium* 感染症に対する有効な治療薬は見つかっていない。

Cryptosporidium を含む全てのアピコンプレックス門原虫は虫体の前端に、apical complex と呼ばれる特徴的な複合構造を有している。apical complex は、conoid、apical/polar ring および subpellicular microtubule と呼ばれる細胞骨格器官(cytoskeletal organelle) や、分泌器官(secretory organelle) である rhoptry、microneme および dense granule で構成されており、虫体が宿主細胞に接着、侵入する際に重要な役割を担っていることが予想されているが、詳細な機能の解明には至っていない。これら原虫の感染機構や宿主の防御機構を解明するためには、apical complex を中心とした宿主細胞への侵入に関わる原虫特異的な器官の構造と機能、さらには虫体と宿主細胞間の相互作用を

明らかにすることが重要である。

アピコンプレックス門原虫の中でも *Eimeria tenella* や *Toxoplasma gondii* の apical complex を構成する器官やタンパク質について比較的解析が進んでいる。例えば、*Eimeria* の microneme は、原虫が宿主細胞に接着するために必須の ligand を含むタンパク質を虫体の前端から分泌する機能を担っている。*Toxoplasma* の conoid はフィラメント様の構造を有し、宿主細胞膜への侵入時に虫体を強固に支持し、subpellicular microtubule は虫体の膜の直下にらせん状に存在し、虫体の形態保持、運動性に関与すると考えられている。しかし、apical complex の細胞骨格器官が actin や myosin、tubulin のようなタンパク質成分から構成されているのか、また細胞骨格運動を制御する関連タンパク質を有するかは不明である。*Eimeria* や *Toxoplasma* に比べて、*Cryptosporidium* では虫体の微細構造さえ明らかにされていない。

本研究では、アピコンプレックス門、特に *Cryptosporidium* について虫体の apical complex を含む微細構造を明らかにし、宿主細胞への侵入に関わる原虫タンパク質の同定と機能解明を目的とした。

第1章 *Cryptosporidium* における apical complex の微細構造の解析

C. parvum スポロゾイトについて、電子顕微鏡による観察および免疫学的手法を用いて *Cryptosporidium* の微細構造を解析した。その結果、スポロゾイトの前端には、分泌器官として、1つの rhoptry、複数の microneme および dense granule、また細胞骨格器官として、3つの apical ring、その直下に electron-dense collar、後端へと延びる2本の central microtubule が観察された。conoid や subpellicular microtubule は観察されず、スポロゾイトの表層を覆う2層の膜間の全ての部位において longitudinal ridge が観察された。また、 α -tubulin 認識モノクローナル抗体 (mAb) を用いた免疫電顕では、apical ring、electron-dense collar および central microtubule の部位に陽性反応が検出された。オーシスト可溶化抗原のウェスタンブロッティングでは、 α -tubulin と推測される約 50kDa (pI 6.24) の抗原が検出された。以上の結果より、宿主細胞の上皮のみに感染し増殖する *C. parvum* は、アピコンプレックス門に属する他種の虫体とは異なる骨格構造を持ち、細胞骨格構成成分の1つである α -tubulin が含まれていることが判明した。また、subpellicular microtubule を欠く代わりに、longitudinal ridge または central microtubule が

スポロゾイトの長型を支持している可能性が示唆された。

第2章 *Cryptosporidium* の apical complex 抗原の解析

Eimeria 感染症に対するワクチン候補抗原として報告されている microneme タンパク質のサブファミリーの1つ microneme protein 2 (MIC2) を認識するマウス mAb を用いて、*Cryptosporidium* について抗原解析を行った。その結果、*C. parvum* スポロゾイトの前端の apical complex 領域に陽性反応が検出された。これは *Cryptosporidium* に MIC2 と類似するタンパク質が存在する可能性を示唆している。さらに、*Eimeria* の apical complex を認識する6種のニワトリ mAb を用いて、*Cryptosporidium* との交差性について検討した。その結果、*Eimeria* の conoid を特異的に認識する mAb 6D-12-G10 を用いた間接免疫蛍光染色により、小腸寄生の *C. parvum* のスポロゾイトとメロゾイト、胃寄生の *C. muris* のスポロゾイトの前端に抗原物質を確認した。ウエスタンブロッティングでは、*C. parvum* と *C. muris* で約 48kDa の抗原が検出された。これらの抗原結合部位は、糖鎖除去処理を行っても反応性を有したことから、タンパク質を構成するペプチド鎖であると考えられた。以上の結果より、ニワトリ mAb により同定された抗原の局在する器官は不明ではあるが、新規のタンパク質様物質であることが強く示唆された。

第3章 *Cryptosporidium* conoid 様抗原の解析

Cryptosporidium の conoid 様抗原の性状を解析するため、actin、myosin および α -、 β -、 γ -tubulin に対する mAb を用いて、スポロゾイトの細胞骨格タンパク質の分布を確認することで conoid 様抗原の局在と比較した。その結果、*Cryptosporidium* conoid 様抗原は、スポロゾイトの β - および γ -tubulin の局在部位と一致した。免疫電顕による観察では、conoid 様抗原は *C. parvum* スポロゾイトの前端部分の膜表面および直下に局在することが判明した。HCT-8 細胞を用いた *in vitro* 侵入抑制試験では、mAb 6D-12-G10 は *C. parvum* スポロゾイトの細胞への侵入を有意に抑制した。以上の結果から、*Cryptosporidium* の conoid 様抗原は、スポロゾイトの前端の膜付近に局在し、宿主への細胞侵入に関わる細胞骨格あるいはその関連タンパク質であることが示唆された。*Cryptosporidium* apical complex の conoid 様抗原の性状をさらに詳細に解析するために、2次元電気泳動、ウエスタンブロッティングにより分離、同定し、質量分析を行った。

本抗原は *C. parvum* で約 48kDa、pI 9.74 のタンパク質として同定された。このタンパク質をトリプシンで消化し、その部分断片を LC-MS/MS で解析した。得られた成績を NCBI 登録データで相同性検索を行った結果、*C. parvum* elongation factor-1 α (EF-1 α) と同定された。以上の結果から、アピコンプレックス門 conoid 様抗原は EF-1 α であり、宿主細胞への侵入過程において虫体の運動に関与するタンパク質であることが示された。

総括

本研究では、アピコンプレックス門原虫、特に *Cryptosporidium* の感染機構解明につながる apical complex タンパク質の同定、解析を行い、以下の結論を得た。

1. *C. parvum* スポロゾイトの apical complex には、アピコンプレックス門原虫に共通する分泌器官が観察されたが、conoid や subpellicular microtubule のような構造は認められず、他のアピコンプレックス門原虫とは異なる骨格構造を有することが判明した。
2. *Eimeria* の MIC2 を認識する mAb を用いた解析では、*C. parvum* スポロゾイトの apical complex 領域に陽性反応が検出され、*Cryptosporidium* の apical complex に MIC2 と類似するタンパク質が存在する可能性が示唆された。
3. *Eimeria* の conoid を認識する mAb 6D-12-G10 による解析では、*C. parvum*、*C. muris* の虫体の前端に約 48kDa の conoid 様タンパク質が検出された。
4. *In vitro* において、*C. parvum* の宿主細胞への侵入は、mAb 6D-12-G10 により抑制された。*Cryptosporidium* conoid 様抗原は、*C. parvum* スポロゾイト前端の膜表面およびその直下に存在する細胞骨格関連タンパク質であることが示唆された。
5. *C. parvum* を用いた LC-MS/MS 解析により、アピコンプレックス門 conoid 様抗原は elongation factor-1 α であることが判明した。

審査結果の要旨

Cryptosporidium は世界的に広く分布するアピコンプレックス門に属する原虫であり、*Plasmodium*、*Toxoplasma*、*Theileria* および *Eimeria* が含まれる。ヒトや動物が *Cryptosporidium* に感染した場合、多くの症例では無症状であるが、ときに激しい水様下痢を示すことがある。免疫不全状態の宿主や幼獣では難治性、再発性となり、致死性の下痢を発症する。現在まで *Cryptosporidium* 感染症に対する有効な治療薬は開発されていない。*Cryptosporidium* を含む全てのアピコンプレックス門原虫は虫体の前端に、apical complex と呼ばれる特徴的な複合構造を有している。apical complex は、細胞骨格器官や分泌器官で構成されており、虫体が宿主細胞に接着、侵入する際に重要な役割を担っていると予想されているが、詳細な機能解明には至っていない。アピコンプレックス門原虫の感染機構や宿主の防御機構を解明するためには、apical complex を中心とした宿主細胞への侵入に関わる原虫特異的な器官の構造と機能、さらには虫体と宿主細胞間の相互作用を明らかにすることが重要である。アピコンプレックス門原虫の中でも *Eimeria tenella* や *Toxoplasma gondii* の apical complex を構成する器官やタンパク質について比較的解析が進んでいる。しかし、それらの細胞骨格器官が actin や myosin、tubulin のようなタンパク質成分から構成されているのか、また細胞骨格運動を制御する関連タンパク質を有するかは不明である。同門の *Eimeria* や *Toxoplasma* に比べて、*Cryptosporidium* では虫体の微細構造さえ明らかにされていない。本研究では、アピコンプレックス門、特に *Cryptosporidium* について虫体の apical complex を含む微細構造を明らかにし、宿主細胞への侵入に関わる原虫タンパク質の同定と機能解明を行うことを目的として実験を行い、以下の結果を得た。

第1章では、*Cryptosporidium* における apical complex の微細構造を解析した。宿主細胞侵入型虫体であるスポロゾイトの前端には、分泌器官として、1つの rhoptry、複数の microneme および dense granule、また細胞骨格器官として、3つの apical ring、その直下に electron-dense collar、後端へと伸びる2本の central microtubule が観察された。conoid や subpellicular microtubule は観察されず、スポロゾイトの表層を覆う2層の膜間の全ての部位において longitudinal ridge が観察された。 α -tubulin 認識モノクローナル抗体 (mAb) を用いた免疫電顕では、apical ring、electron-dense collar および central microtubule の部位に陽性反応が検出された。オーシスト可溶性抗原の解析では、 α -tubulin と推測される約 50kDa (pI 6.24) の抗原が検出された。以上の結果より、宿主細胞の上皮のみに感染し増殖する *C. parvum* はアピコンプレックス門に属する他種の虫体とは異なる骨格構造を持ち、細胞骨格構成成分の1つである α -tubulin を含むことが判明した。また、subpellicular microtubule を欠く代わりに、longitudinal ridge または central microtubule がスポロゾイトの長型を支持している可能性が示唆された。

第2章では、*Cryptosporidium* の apical complex 抗原を mAb を用いて解析した。同門の *Eimeria* 感染症に対するワクチン候補抗原として報告されている microneme protein 2 (MIC2) を認識するマウス mAb は、*C. parvum* スポロゾイトの前端の apical complex 領域を認識した。これは *Cryptosporidium* に MIC2 と類似するタンパク質が存在する可能性を示唆している。さらに、*Eimeria* の apical complex を認識する6種のニワトリ mAb

を用いて、*Cryptosporidium* との交差性を検討した。conoid を特異的に認識する mAb 6D-12-G10 を用いた間接免疫蛍光染色により、小腸寄生の *C. parvum* スポロゾイトとメロゾイト、胃寄生の *C. muris* スポロゾイトの前端に陽性反応を確認した。ウエスタンブロッティングでは、*C. parvum* と *C. muris* で約 48kDa の抗原が検出された。これらの抗原結合部位は、過ヨウ素酸処理後でも反応性を有したことから、タンパク質を構成するペプチド鎖であると考えられた。以上の結果より、ニワトリ mAb により同定された抗原の局在する器官の種類は不明ではあるが、新規タンパク質様物質であることが強く示唆された。

第 3 章では、*Cryptosporidium* apical complex 構成要素である conoid 様抗原の性状を解析した。actin、myosin および α -、 β -、 γ -tubulin に対する mAb を用い、スポロゾイトの細胞骨格タンパク質の分布を観察し、conoid 様抗原の局在と比較した。*Cryptosporidium* conoid 様抗原は、スポロゾイトの β - および γ -tubulin の局在部位と一致した。免疫電顕では、conoid 様抗原は *C. parvum* スポロゾイトの前端部分の膜表面および直下に観察された。HCT-8 細胞を用いた *in vitro* 侵入抑制試験では、mAb 6D-12-G10 は *C. parvum* スポロゾイトの細胞への侵入を有意に抑制した。これらの結果から、*Cryptosporidium* の conoid 様抗原は、スポロゾイトの前端の膜付近に局在し、宿主への細胞侵入に関わる細胞骨格あるいはその関連タンパク質であることが示唆された。この抗原は 2 次元電気泳動およびウエスタンブロッティング解析により、分子量 48kDa、pI 9.74 のタンパク質として同定された。このタンパク質トリプシン消化部分断片を LC-MS/MS で解析し、得られた成績を NCBI 登録データで相同性検索を行った結果、*C. parvum* elongation factor-1 α (EF-1 α) と同定された。以上の結果から、アピコンプレックス門 conoid 様抗原は EF-1 α であり、宿主細胞への侵入過程において虫体の運動に関与するタンパク質であることが示された。

本研究は、現在、治療法や予防法が確立されていない *Cryptosporidium* 感染症の感染防御法を開発するために重要な知見を提供している。更に本研究において解析した conoid 様抗原は *Cryptosporidium* 以外のアピコンプレックス門に属するヒトと動物の共通感染症を引き起こす原虫が保有していることから、これらの成績は獣医学ならびに医学に大きく貢献するものと評価できる。本論文の審査および学力確認の結果を合わせて博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。