

学 位 論 文 題 名

Studies on classification of
the *Theileria sergenti*/*buffeli*/*orientalis* group parasites

(*T. sergenti*, *T. buffeli* および *T. orientalis* 群原虫の
分類に関する研究)

学位論文内容の要旨

1905年に我が国のウシから検出された小型ピロプラズマは、1978年になってピロプラズマ目タイレリア科の *Theileria sergenti* と同定された。*T. sergenti* に起因する小型ピロプラズマ病は我が国の畜産振興上重要な疾病であり、類似のタイレリア種が日本、オーストラリア、韓国、英国、および北米など温帯から熱帯にかけての世界各地に分布している。現在これらのタイレリア種の学名としては *T. sergenti*, *T. orientalis* および *T. buffeli* が日本、ヨーロッパおよびオーストラリアの研究グループによってそれぞれ別個に用いられているが、個々の原虫間での詳細な比較検討はおこなわれていない。一方、我が国のウシ寄生性タイレリア種について現在用いられている学名 *T. sergenti* は1926年に記載された羊のタイレリア種に対して既に使用されており、これを再びウシのタイレリア種の学名として用いることは異物同名（ホモニム）となって命名規約上適当でないとの指摘がなされている。このような混乱した状況を解決し我が国のウシ寄生性タイレリア種を分類上どのように位置づけるべきかを検討した。

まず、各研究グループがそれぞれ *T. sergenti*, *T. orientalis* および *T. buffeli* と称している原虫株を入手し、それらの赤内型原虫（ピロプラズム）の構成蛋白質を二次元電気泳動で比較した。この結果、大部分の主要蛋白質のスポットは3種の原虫に共通していたが33/34 kilodalton (kDa) の塩基性主要蛋白質や他のいくつかのマイナーなスポットには差異が認められた。*T. sergenti* の塩基性主要蛋白質が33kDaであったのに対して、*T. buffeli* および *T. orientalis* では34kDaの位置にこの蛋白質のスポットが検出された。これらの蛋白質分子の間には分子量の差だけではなく等電点の差も認められ、*T. sergenti* が、ピロプラズムの主要蛋白質の生化学的性状から *T. buffeli* および *T. orientalis* と区別されうることが明らかとなった。

ウェスタンブロットによる解析では、これら33/34kDa 蛋白質が各原虫の主要抗原 (34kDa) は互いの感染牛血清と強く反応したが、*T. sergenti* 感染牛血清とは弱い反応を示した。また *T. sergenti* の主要抗原 (33kDa) と *T. buffeli* および *T. orientalis* 感染牛血清との間には著明な交叉反応は認められなかった。各原虫の可溶化抗原を用いた酵素抗体法 (ELISA) においてもウェスタンブロットと同様の交叉反応が、抗原-感染牛血清間に認められた。Biotin-avidin プロテインブロット法により、これら33/34kDa 主要抗原はともに原虫細胞の表面に分布していることが明らかとなった。

次に遺伝子レベルでも比較する目的で、*T. sergenti* および *T. buffeli* のピロプラズムより調製した mRNA を鋳型として、それぞれの cDNA ライブラリーを λ gt11 を用いて作製した。各ライブラリーから *T. sergenti* の表在性主要抗原 (33kDa ; p 33) および *T. buffeli* の同抗原 (34kDa ; p 34) を発現するクローンをイムノスクリーニングにより選択した。これらの発現蛋白質をウェスタンブロットで解析した結果、組換え体 p 33 および p 34 は *T. sergenti*, *T. buffeli* および *T. orientalis* 感染牛血清と同等に反応した。塩基配列解析の結果、p 33 および p 34 を発現する cDNA クローンには全長 849 base pair (bp) の蛋白質コード領域がともに存在している。これらの塩基配列より翻訳された両アミノ酸配列 (283 アミノ酸) の相同性は 82% で、それらの推定分子量は約 32.2 kDa であった。両配列の N 末端側には N-グリコシル化が可能なアスパラギン残基がともに認められ、それは p 33 では 2 カ所、また p 34 では 3 カ所であった。そのうち最も N 末端寄りの 1 カ所のみが両者に共通していた。これらのことから、p 33 および p 34 は糖鎖の付加によって分子量が異なり、またその糖鎖部分に感染牛血清によって認識される種特異的なエпитープを包含する類似の蛋白質である可能性が観察された。

p 33 および p 34 をコードする遺伝子の塩基配列には 84% と高い相同性が認められたが、両者にはいくつかの異なる制限酵素認識部位が存在していた。p 33/34 遺伝子の両端部配列よりデザインしたプライマーを用いて、polymerase chain reaction (PCR) で *T. sergenti*, *T. buffeli* および *T. orientalis* のゲノム DNA から同遺伝子の増幅を試みたところ、単一の遺伝子断片が増幅された。この遺伝子断片の長さは cDNA の塩基配列より予想されたそれに一致していた。次に、*T. sergenti* および *T. buffeli* のゲノム DNA より PCR で増幅した p 33/34 遺伝子を cDNA 塩基配列上で両者に共通しない制限酵素認識部位で切断したところ、両増幅遺伝子はそれぞれに特徴的な切断パターンを示し、容易に識別された。また、*T. orientalis* のゲノム DNA より増幅した同遺伝子の制限酵素切断パターンは *T. buffeli* の p 34 遺伝子のそれと、使用した酵素のすべてにおいて一致していた。これらのことから、PCR で各原虫のゲノム DNA

から p 33/34 遺伝子を増幅し、それらを制限酵素で切断することにより、それぞれ p 33 および p 34 を主要抗原とする *T. sergenti* および *T. buffeli*/*T. orientalis* を容易に識別可能な手法が確立された。

以上の成績から、*T. sergenti*, *T. buffeli* および *T. orientalis* は、ピロプラズム期の原虫構成蛋白質、特にこれらの原虫細胞の表面に分布する主要抗原(p 33/34) の差異と、この p 33/34 によって規定される血清学的性状の差異によって *T. sergenti* と *T. buffeli*/*T. orientalis* の 2 群に分類されうることが確かめられた。さらに、p 33/34 遺伝子を各原虫ゲノムから PCR で増幅し、その制限酵素切断パターンを比較することによって *T. sergenti* と *T. buffeli*/*T. orientalis* を容易に識別可能な手法も確立された。

したがって、現在、我が国のウシ寄生性タイレリア種、いわゆる小型ピロプラズマ原虫の学名として用いられている *T. sergenti* は命名学上不適當であることから、種名の検討を早急におこなう必要があると結論された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	小 沼	操
副 査	教 授	清 水	悠紀臣
副 査	教 授	神 谷	正 男
副 査	助教授	杉 本	千 尋

我が国のウシ小型ピロプラズマ病はピロプラズマ目タイレリア科の *Theileria sergenti* に起因する疾病である。類似のタイレリア種は温帯から熱帯にかけての世界各国に分布しているが、これら個々の原虫間での詳細な比較検討は行われていない。また *T. sergenti* の学名はヒツジのタイレリア種に対して既に使用されており、ウシのタイレリア種の学名として用いることは異物同名（ホモニム）となる。申請者はこのような混乱した状況を解決し、我が国のウシ寄生性タイレリア種を分類学上どのように位置づけるべきかを検討した。本論文は英文72頁からなり参考文献13編を付している。

まず *T. sergenti*, *T. orientalis* および *T. buffeli* の赤内型原虫（ピロプラズム）の構成蛋白質を比較した。主要蛋白質は *T. sergenti* で33kDa, *T. buffeli* および *T. orientalis* では34

kDa であった。*T. buffeli* および *T. orientalis* の主要抗原 (34kDa) は互いに強い交差反応を示したが、*T. sergenti* の主要抗原 (33kDa) とは著明な交差反応は認められなかった。

次に *T. sergenti* と *T. buffeli* 主要抗原遺伝子をクローニングし、その塩基配列を解析した。両遺伝子には全長849塩基の蛋白質コード領域が存在していた。塩基配列より翻訳された両アミノ酸配列 (283アミノ酸) の相同性は82%で、これらの推定分子量は約32.2kDa であった。両遺伝子の塩基配列には84%と高い相同性が認められたが、両者にはいくつかの異なる制限酵素認識部位が存在していた。両遺伝子の両端部配列より設計したプライマーを用いて、Polymerase chain reaction (PCR) で *T. sergenti*, *T. buffeli* および *T. orientalis* のゲノムDNA から同遺伝子の増幅を試みたところ、単一の遺伝子断片が増幅された。これら PCR で増幅した遺伝子を制限酵素で切断したところ、*T. buffeli* と *T. orientalis* は全く同じ切断パターンを示したが *T. sergenti* のそれは異なっていた。以上の成績から、*T. sergenti*, *T. buffeli* は主要抗原の分子量、その血清学的性状ならびに遺伝子の制限酵素切断パターンにより *T. sergenti* と *T. buffeli*/*T. orientalis* の2者に分類されうること示した。この研究はウシ寄生性タイレリア種の比較をとおり、我が国の *T. sergenti* の命名の再考に重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は、河津信一郎氏が博士 (獣医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。