

学 位 論 文 題 名

タイレリア原虫の遺伝的多型性と
その表面蛋白質の免疫学的解析

学位論文内容の要旨

日本のタイレリア原虫 (*Theileria sergenti*) は、これまでにピロプラズム主要表面蛋白 (MPSP) 遺伝子の塩基配列に基づきI型、C型、B-2型の3型に型別されている。日本各地の分離株中にはこれら3型が混在して複雑な原虫集団を形成していることが明らかになってきた。類似のタイレリア種がアジア、オーストラリア、ヨーロッパ、および北米などの温帯から熱帯にかけて世界各地に分布しているが、それらの詳細な研究は現在まであまりなされていない。そこで、遺伝子レベルで異なる原虫の混在状況が、世界各地に分布する良性タイレリア原虫でも見られるかどうかを検討するために、各国のタイレリア分離株のMPSP遺伝子を調べた。中国、台湾の野外分離株ではC型が優位に検出され、その他に中国分離株ではC, I, B-2型が、台湾ではB-1型が混在していた。韓国分離株は全株からI型が検出され、C, B-1, B-2型の混在も確認された。イタリア、イギリス分離株では共にB-1型が検出され、イタリアではC型の混在が見られた。以上の各国分離株は、*T. sergenti* / *buffeli* / *orientalis*群に属する原虫であることが、MPSP遺伝子による系統分類で示された。一方、タイ、アメリカ分離株、ならびに中国の1株は従来のPolymerase chain reaction (PCR)による型別法では分類できなかったが、*T. parva*や*T. annulata*のMPSP遺伝子も含めこれらの間で保存された領域の塩基配列からプライマーを設計し、PCRを行ったところMPSP遺伝子が増幅できた。そこでその塩基配列を基に既知のタイレリア原虫との系統関係を調べた。その結果、これらの原虫は*T. sergenti* / *buffeli* / *orientalis*群の原虫とは異なる新たな良性タイレリア原虫群であると考えられた。

次にMPSP遺伝子の多様化が、ウシの良性タイレリア原虫でのみ見られるものであるか、それともタイレリア属原虫全般でも同様の多型性が観察されるのかを検討するために、家畜および野生動物のタイレリア原虫のMPSP遺伝子ならびに18SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を調べた。その結果、野生動物のタイレリア原虫にも多様なMPSPを有する原虫が存在することが明らかとなった。MPSP遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析から、タイレリア原虫は3群に分類された。第1の群は*T. parva*を代表とする悪性タイレリア原虫の群で、第2の群は*T. sergenti* / *buffeli* / *orientalis*を代表とする良性タイレリアの

群であった。第3の群は*T. mutans*, *T. sp.* (インパラ), *T. sp.* (クドゥ)からなっていた。一方、家畜および野生動物のタイレリア原虫において、18SリボソームRNA遺伝子にも多型性が検出され、同一個体でも複数の遺伝子型を持つ原虫が混在していることが明らかとなった。また、系統樹解析の結果から、タイレリア属原虫は二系統からなるバベシア属原虫とは異なり、一群のクラスターを形成することが示された。

MPSPはピロプラズム原虫蛋白の中でも発現量が高く、宿主免疫系が認識する第一の標的分子である。したがって、MPSP分子の多型性と原虫の宿主免疫回避は関連づけられると考えられる。そこで次にMPSPに対する宿主細胞性免疫応答とMPSP型特異性を検討するために以下の免疫学的解析を行った。大腸菌発現系を用いて組み換えMPSP蛋白 (C型) を作製し、マンナン被覆リポソームに封入してウシに接種した。最終免疫直後から、試験に供した全3頭でMPSPに対するリンパ球の幼若化が検出された。MPSPに反応し増殖する細胞はCD4⁺T細胞で、反応はMHCクラスII に拘束されていた。また、MPSPに反応して増幅するT細胞のサイトカインプロファイルをReverse transcription (RT)-PCRによって調べた結果、それらの細胞ではインターフェロン・ガンマが最も高レベルで発現していた。その他にインターロイキン2、インターロイキン10、腫瘍壊死因子アルファのm-RNAの転写も確認された。免疫に用いたMPSPと異なる型 (I型ならびにB-1型) の組み換えMPSPに対するT細胞の幼若化反応を調べたところ、3頭中2頭で反応に型特異性が観察された。さらに、エピトープマッピングを行った結果、2頭のウシに対してDTSKFTPTVAHRLKHAEDLF⁹²が、他の1頭のウシではGTGKVYDFVGNFKVTKVKFE¹⁸²がT細胞エピトープとなることが明らかとなった。これらの配列をMPSPの型間で比較したところいくつかのアミノ酸に変異が見られ、MPSPの多様性と宿主の細胞性免疫回避の関連が示された。

以上、MPSPおよび18SリボソームRNA遺伝子の塩基配列から家畜ならびに野生動物において極めて多様なタイレリア原虫種が存在することが明らかにされ、また、原虫が宿主免疫応答を回避する過程でMPSP遺伝子の多様性が生じてきた可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 前 出 吉 光
副 査 助 教 授 奥 祐 三 郎
副 査 助 教 授 杉 本 千 尋

学 位 論 文 題 名

タイレリア原虫の遺伝的多型性と その表面蛋白質の免疫学的解析

日本のタイレリア原虫 (*Theileria sergenti*) は、ピロプラズム主要表面蛋白 (MPSP) 遺伝子の塩基配列に基づき I、C、B の 3 型に型別されている。日本各地の分離株中にはこれら 3 型が混在して複雑な原虫集団を形成している。類似の良性タイレリア種がアジア、オーストラリア、ヨーロッパおよび北米などの温帯から熱帯にかけて世界各地に分布しているが、それらの詳細な研究はなされていない。

そこで世界各国のウシに分布する良性タイレリア原虫ならびに野生反芻獣から分離されたタイレリア属原虫について、その MPSP 遺伝子多型性を調べた。併せて MPSP に対する宿主の免疫応答を解析した。

まず各国のウシから分離されたタイレリア分離株の MPSP 遺伝子および small subunit ribosomal RNA 遺伝子を比較した。その結果、中国、台湾、イタリア、オーストラリアの分離株では C 型と B 型が、韓国の分離株では I 型が主に検出された。アメリカ、タイ、中国の分離株では従来の良性タイレリアとは異なるタイレリア原虫が検出された。また野生反芻獣からのタイレリア分離株にも MPSP 遺伝子の多型がみられた。系統樹解析からタイレリア属原虫は、1) *T. parva* を代表とする悪性タイレリア原虫 2) *T. sergenti* を含む良性タイレリア原虫 ならびに 3) *T. mutans* を含む原虫 の 3 群に分類された。

次に MPSP 抗原多様性と宿主免疫応答について検討した。組み換え MPSP をマンナン被覆リポソームに封入しウシに免疫したところ MPSP 特異的リンパ球幼若化反応が認められた。増殖細胞は CD4⁺ T 細胞で原虫 MPSP 型特異的増殖を示し、インターフェロン γ 、インターロイキン 2、10 ならびに腫瘍壊死因子 α 等の mRNA の転写が検出された。MPSP に対する T 細胞エピトープマッピングを行った結果、エピトープの領域のアミノ酸配列は原虫間で相違がみられ、MPSP の多様性と原虫の宿主免疫反応からの回避との関連性が示唆された。

本研究によりウシをはじめ野生の反芻獣には多様なタイレリア原虫種が存在することが明らかとなった。この成績はタイレリア感染症の制圧を考える際、重要な知見を示している。よって審査員一同は、角田 勤氏が博士 (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。