博士（獣医学） 迫 康仁

学位論文題名

Theileria sergenti 遺伝子クローニングおよび *Theileria* 属原虫ゲノム構造比較解析

学位論文内容の要旨

小型ピロプラズマ症は、*Theileria sergenti* 原虫の赤血球内寄生に伴う貧血および発熱を主徴とする疾病である。本原虫の単独感染での病原性は低いが、飼育環境の変化、輸送、妊娠、ウイルス・細菌・住血原虫(バベシア)を含む他の病原体の混合感染等によるストレス負荷により、急激な原虫増殖が誘発され発症に至ると考えられている。重篤な貧血を示した場合、死亡することも希ではない。その経済的損失が大きいことから本原虫症は日本での家畜衛生において重要な位置を占めている。しかし、本症の防御法は確立されておらず、また宿主体内での動態、貧血発症の機序等不明な点が多い。そこで、本研究は *T. sergenti* 感染症のコントロール法開発を目的とし、原虫特異的な化学療法剤の開発および効果的な免疫賦与法の開発に必要である原虫の各種遺伝子のクローニングと構造解析を行い、さらに原虫株間の多型性解析を行った。

まず、*T. sergenti* に特異的な効果を発揮する化学療法剤の開発を目的とし、システインプロテアーゼの遺伝子クローニングを行いその塩基配列を決定した。その結果、システインプロテアーゼ cDNA クローンは 402 個のアミノ酸をコードしており、その予測分子サイズは 46.4 kDa であった。また、システインプロテアーゼがピロプラズムステージでも発現していることを明らかにした。さらに、池田(I)型および千歳(C)型原虫間でシステインプロテアーゼ遺伝子内の制限酵素認識配列や遺伝子のフランキング領域に多型性が存在することを明らかにした。

次に *T. sergenti* 感染症に対するワクチン開発を目的とし抗原蛋白質遺伝子のクローニングを行った。現在までに主要ピロプラズム表面蛋白質(MPSP)のワクチン抗原としての有用性が示されているが、その効果が十分ではないことから他の抗原の探索が必要とされている。ピロプラズム表面蛋白質の１つである分子サイズ 23 kDa の抗原蛋白質(p23)はワクチン抗原候補と考えられている。その遺伝子解析の結果、I 型および C 型間での多型性がすでに確認されている。p23 を免疫賦与抗原として使用するには、MPSP 遺伝子で示されているような表面抗原型の異なる原虫の混合感染があるのかを明らかにする必要がある。そこで、今回 p23 のアレル特異的 polymerase chain reaction (PCR) 法を開発し、実験継代株および日本国内分離株を用いて分子疫学解析を加えた。その結果、*T. sergenti* は C 型および I 型原虫の混合集団として感染牛内に存在していることが明らかとなった。また、世界に広く分布している *T. buffeli* (B 型)の p23 遺伝子をクローニングしその塩基配列を決定した。その結果、B 型 p23 はアミノ酸レベルで C 型 p23 と 93.5 %の相同性を示し、N 型糖鎖付加部位や C-末端部位の Valine に富んだ領域は保存されていた。

T. sergenti 感染症に対するワクチン開発の標的ステージとして、貧血という病態に主に関与するステージであるピロプラズムで発現される抗原蛋白質の解析が行われてきた。しかしながら、多くの原虫抗原蛋白質はステージ特異的に発現していることが知られており、この虫体構成蛋白質のステージ間の発現変化が寄生虫の宿主免疫応答回避機構の１つと考えられている。そこで、ピロプラズムと感染ステージであるスポロゾイトの両ステージで発現している抗原蛋白質の遺伝子クローニングを行った。その結果、両ステージで発現している分子サイズ 60 kDa の新規抗原蛋白質 Ag60 を同定した。Ag60 は免疫電子顕微鏡法を用いた観察より、アピカルコンプレックス門原虫に特徴的な構造物であるロプトリーに存在する蛋白質であることを明らかにした。また、I 型および C 型原虫

間で Ag60 の遺伝的・抗原的多型性が示された。これらステージ共通抗原を用いることにより、ステージ毎での抗原変換による原虫の宿主免疫応答回避機構を克服できるワクチンの開発の可能性が示された。

本研究で行った一連の遺伝子解析から、*T. sergenti*原虫内の多型性が示された。原虫の遺伝的多型性の生じる要因の 1 つは有性生殖を介した染色体の組換えである。そこで、これを解析するための重要な基礎情報となる原虫のゲノム構造の解析を行った。さらに、二種の *Theileria*属原虫間のゲノム構造の比較解析を行い、種の分化の過程でゲノム構造に変化が生じ、それが病原性に影響するかについて考察を行った。

パルスフィールドゲル電気泳動法を用いた解析より、*T. sergenti* は *T. parva* と同様に 4 本の染色体を有していることが明らかとなり、*Theileria* 属原虫間の染色体数やそのサイズの差は少ないことが示された。さらに、現在までにクローニングされている遺伝子の位置している染色体を調べ、MPSP 遺伝子は第 1 染色体上に、p23、システインプロテアーゼ、Heat shock protein (Hsp) 70 遺伝子は第 2 染色体上に、small subunit ribosomal RNA (SSUrRNA)遺伝子は第 1 および第 3 あるいは 4 染色体上に存在していることを明らかにした。

次に、二種の *Theileria*属原虫間(*T. parva* と *T. sergenti*)のゲノム構造の比較を house keeping 遺伝子をマーカーとして用いた染色体核型解析により行った。その結果、本研究で使用したほとんどの遺伝子の位置する染色体は同一であった。つまり、両種間でシンテニーの保存が観察された。しかしながら、システインプロテアーゼ遺伝子下流域の染色体構造に違いが観察された。すなわち、*T. sergenti* においてシステインプロテアーゼ遺伝子は Hsp 遺伝子(第 2 染色体)と連鎖していたが、*T. parva* では連鎖していなかった。このような染色体構造の違いは、*T. parva* の第 2 および第 3 染色体がシステインプロテアーゼ遺伝子下流域で交差することにより生じたためと解釈することができた。この仮説は、*T. parva* においてシステインプロテアーゼ遺伝子は SSUrRNA 遺伝子(第 3 染色体)と連鎖しているのに対し、*T. sergenti* では連鎖していないという結果によっても支持される。この染色体交差の際、スポロゾイトの宿主細胞に対する親和性を決定する p67 遺伝子が欠損してしまった可能性が推察され、染色体構造の変化が *Theileria* 属原虫の種分化において極めて重要な意味をもつと考えられた。

今後、本研究でクローニングされた遺伝子の情報に基づいてより有効な *T. sergenti*感染症コントロール法開発への道が開けると思われる。また、ゲノム構造および各遺伝子の位置する染色体が明らかとなったことより、それら遺伝子をマーカーとして用い、有性生殖を介した遺伝子多型性の生じる機構を明らかに出来ると考えられる。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　小　沼　　操
副　査　教　授　斉　藤　昌　之
副　査　教　授　渡　邉　智　正
副　査　助教授　杉　本　千　尋

学 位 論 文 題 名

Theileria sergenti 遺伝子クローニングおよび *Theileria* 属原虫ゲノム構造比較解析

Theileria sergenti 感染症の防御法はいまだ確立されておらず、宿主体内での動態、貧血発症の機序についても不明な点が多い。本研究は *T. sergenti* 感染症の防御法の開発を目的とし、原虫の各種遺伝子のクローニングと原虫株間の多型性解析を行った。

まず、*T. sergenti* に対する化学療法剤の開発を目的とし、システインプロテアーゼの遺伝子クローニングを行いその塩基配列を決定した。システインプロテアーゼ cDNA クローンは402個のアミノ酸をコードしており、予測分子サイズは46.4kDaであった。

次に *T. sergenti* と *T. buffeli* の抗原蛋白遺伝子のクローニングを行い、ピロプラズム表面蛋白質の 23kDa 抗原（p23）遺伝子の多型性を明らかにした。また、ピロプラズムとスポロゾイトの両ステージで発現している 60kDa の新規抗原 Ag60 を見出した。Ag60 は免疫電子顕微鏡観察よりロプトリーに存在する蛋白質であり、Ag60 は両ステージで発現することよりワクチンに利用できる可能性が示された。

今回の遺伝子解析から *T. sergenti* 原虫内での遺伝子多型性が示され、原虫の遺伝子多型性の生じる要因の１つは有性生殖を介した染色体の組換えが考えられる。そこで、原虫のゲノム構造の解析を行った。その結果、*T. sergenti* は４本の染色体を有しており、既知遺伝子の染色体マッピングを行ったところ、p32 遺伝子は第１染色体上に、p23、システインプロテアーゼ、heat shock protein70 遺伝子は第２染色体上に、small subunit ribosomal RNA 遺伝子は第１および第３あるいは４染色体上に存在していることを明らかにした。

次に、二種の *Theileria* 属原虫間（*T. parva* と *T. sergenti*）のゲノム構造の比較を行った。その結果、本研究で使用したほとんどの遺伝子の染色体上の位置は両原虫間で同一であったが、システインプロテアーゼ遺伝子下流域の染色体構造に違いが観察された。このような染色体構造の違いは、染色体が交差することにより生じたためと考えられる。

本研究によりクローニングされた遺伝子を用いてのワクチン開発の可能性、また既知遺伝子の染色体上の位置が明らかとなり有性生殖の際の遺伝子多型性の生じる機構の解析が可能となった。この研究は *Theileria* 原虫感染症の制圧に重要な知見を提供する。よって審査員一同は、迫　康仁氏が博士（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。