

Genetic Factors of Drug Resistance and Diversity in *Trypanosoma evansi*

(トリパノソーマ・エバンシー原虫の薬剤耐性と遺伝子多型解析)

学位論文内容の要旨

トリパノソーマ原虫症は、アフリカやアジアの家畜および野生動物に感染し、多大な被害を与えている。近年、原虫薬剤耐性株の出現によってその被害は深刻化しているが、どのような機序で薬剤耐性になるかは不明である。本研究は、南アジアに分布するトリパノソーマ・エバンシー(*Trypanosoma evansi* : *T. evansi*)の薬剤耐性機序の解明を目的に以下の項目について検討した。

薬剤の体内取り込みにおいてアデノシントランスポーター(AT)は重要であることが報告されている。そこで、*T. evansi* の同遺伝子の機能解析を行うために AT 遺伝子(*TevAT1*)を決定後、RNA 干渉法(RNAi)によるノックダウン原虫を作出し抗原虫薬である Antrycide、Suramin および Berenil に対する感受性を検討した。その結果、*TevAT1* ノックダウン *T. evansi* は、Antrycide と Suramin に対しては野外株同様の感受性、すなわち耐性を示さなかったが、Berenil に対し顕著な耐性を示した。このことから、Berenil に対する薬剤耐性には *TevAT1* が重要であることが示された。

一方で、Berenil 感受性 *T. evansi* 野外株においても長期継代することによって抵抗性を獲得したことから、サブトラクション法を用いて新規薬剤耐性関連因子について解析した。その結果、原虫表面上に発現する 40kDa の新規分子(*TeDR40*)を得た。*TeDR40* 遺伝子は、Berenil 耐性 *T. evansi* 株では感受性野外株に対し 1000 倍以上発現が亢進していることが明らかとなった。また、同遺伝子を Berenil 感受性野外株に過剰発現した結果、Berenil に対する抵抗性を獲得したことから、Berenil 耐性獲得に同因子が深く関与することが示唆された。

最後に、癌細胞の薬剤の取り込みに関与するレセプターであるトランスフェリンレセプターについても解析を行った。原虫のトランスフェリン遺伝子(*ESAG6*)はイオンや薬剤の取り込みに必須であり、遺伝子多型も報告されていることから、タイ各地の牛、豚、鹿および水牛より分離された *T. evansi* 7 株について遺伝子解析を行った。その結果、タイ分離株において *ESAG6* 遺伝子の多型が認められた。さらに、アフリカのトリパノソーマには認められない *T. evansi* 固有の遺伝子配列が確認された。このことから、トリパノソーマの型別が可能となった。

本研究で、抗トリパノソーマ薬として汎用されている Berenil に対する *T. evansi* の薬剤耐性には *TevAT1* および *TeDR40* が重要であることが示された。さらに、

野外分離株において *ESAG6* 遺伝子の多型が認められたことから、今後の病原性解析に寄与する情報を得たと考えられた。

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 教 授 片 倉 賢
副 査 助 教 授 大 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

Genetic Factors of Drug Resistance and Diversity in *Trypanosoma evansi*

(トリパノソーマ・エバンシー原虫の薬剤耐性と遺伝子多型解析)

トリパノソーマ原虫は、アフリカやアジアの家畜および野生動物に感染し、多大な被害を与えている。近年、抗原虫薬耐性株の出現によってその被害は深刻化しているが、どのような機序で薬剤耐性になるかは不明である。本研究は、南アジアに分布するトリパノソーマ・エバンシー(*Trypanosoma evansi*: *T. evansi*)の薬剤耐性機序の解析を行った。

薬剤の体内取り込みにおいてアデノシントランスポーター(AT)は重要である。そこで、*T. evansi* の AT 遺伝子(*TevAT1*)を RNA 干渉法(RNAi)によりノックダウンした原虫を作出し、抗原虫薬に対する感受性を検討した。その結果、*TevAT1* ノックダウン原虫は、Antrycide と Suramin に対しては野外株同様の感受性、すなわち耐性を示さなかったが、Berenil に対し顕著な耐性を示した。このことから、Berenil に対する薬剤耐性には *TevAT1* が重要であることが示された。一方で、Berenil 感受性野外株においても長期継代することによって抵抗性を獲得したことから、サブトラクション法を用いて新規薬剤耐性因子を解析した。その結果、原虫表面上に発現する 40kDa の新規分子(*TeDR40*)を得た。*TeDR40* 遺伝子は、Berenil 耐性株では発現が亢進していた。また、同遺伝子を Berenil 感受性野外株に過剰発現した結果、Berenil に対する抵抗性を獲得したことから、Berenil 耐性獲得に同因子が深く関与することが示唆された。

原虫のトランスフェリンレセプター遺伝子(*ESAG6*)はイオンや薬剤の取り込みに必須であり、遺伝子多型も報告されている。そこで、最後にタイ各地の牛、豚、鹿および水牛より分離された *T. evansi* 7 株について遺伝子解析を行った。その結果、タイ分離株において *ESAG6* 遺伝子の多型が認められた。さらに、アフリカのトリパノソーマには認められない *T. evansi* 固有の遺伝子配列が確認された。

本研究は、抗トリパノソーマ薬として汎用されている Berenil に対する *T. evansi* の薬剤耐性機序ならびに、野外分離株での遺伝子多型を明らかにしたものであり、

トリパノソーマ病の防疫に貴重な知見を提供した。よって、審査員一同は、申請者が博士（獣医学）の学位をうける資格を有すると認めた。