

学 位 論 文 題 名

Cloning of cDNAs Encoding Proteins in Piroplasm of *Theileria orientalis*

(*Theileria orientalis* 原虫ピロプラズム由来蛋白をコードする
cDNA のクローニング)

学位論文内容の要旨

タイレリア原虫は、ダニ媒介性の血球内寄生性の原虫であり全世界に分布する。中でも我が国に分布する *Theileria orientalis* は、病原性は比較的低いが、時に牛に慢性の貧血などを引き起こす。病態上、赤血球内での増殖ステージ（ピロプラズム）が重要であることが判明しているが、ワクチンなどによる制圧には至っていない。以上のような理由から、本研究では、クローン化した *T. orientalis* が感染した牛赤血球より精製した原虫ピロプラズムより cDNA ライブラリーを作成し、ランダムシークエンス解析により得られた 2 種類の cDNA クローン、*Tocp1* と *Toprh*、について性状解析を行った。

*Tocp1*cDNA クローンは、476 個のアミノ酸配列からなるタンパクをコードする遺伝子としてクローニングされた。予想される *Tocp1* タンパクの一次構造は、高等動物由来チオールプロテアーゼ (EC3.4.22.-) と類似しているが、酵素活性に重要な cysteine active site のシステイン残基がグリシン残基に置換しているため、酵素活性は観察されなかった。Southern blot 解析や原虫ゲノムシークエンス解析の結果、原虫ゲノム中には、*Tocp1* 遺伝子に類似な遺伝子が少なくとも 5 個存在していることが示され、Northern blot および Western blot 解析により *Tocp1* 遺伝子転写物がピロプラズム期に発現していることが示された。*Tocp1* タンパクの *T. orientalis* の寄生・増殖における役割を検討するため、大腸菌組み換え発現系を用いて組み換え *Tocp1* タンパクを発現し、ヘモグロビンとの結合性を ELISA にて検討した。その結果、組み換え *Tocp1* タンパクはヘモグロビンと結合することが確認され、*Tocp1* タンパクが、原虫の牛赤血球内における寄生・増殖に関与していることが示唆された。

Toprh cDNA クローンは、278 個のアミノ酸配列をコードしており、アポトーシスの制御や細胞増殖に関与することが報告されている prohibitin 様分子をコードしていた。そして cDNA クローンと *Toprh* ゲノム遺伝子と比較した結果、89 塩基からなるイントロンが存在していることを同定した。*Toprh* タンパクの予想アミノ酸配列は、*T. parva*、*T. annulata*、および *Plasmodium falciparum* の prohibitin とそれぞれ、93.8、93.1、69.1%の相同性を示した。大腸菌組み換え発現系を用いて発現した組み換え *Toprh* に対する抗血清

を用いて行った Western blot 解析の結果、Toprh がピロプラズム期に発現していることがわかった。Toprh の原虫の寄生・増殖における役割は不明であるが、今後 Toprh と相互作用をする分子、特に *T. orientalis* の増殖に関与する分子などを同定する必要がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操

副 査 教 授 片 倉 賢

副 査 助 教 授 奥 祐三郎

副 査 助 教 授 大 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

Cloning of cDNAs Encoding Proteins in Piroplasm of *Theileria orientalis*

(*Theileria orientalis* 原虫ピロプラズム由来蛋白をコードする
cDNA のクローニング)

ダニ媒介性で血球内寄生性のタイレリア原虫である *Theileria orientalis* は、日本にも分布し病原性は比較的低いが、時に牛に慢性の貧血などを引き起こす。発病機構には、赤血球内での増殖ステージ（ピロプラズム）が重要であることが判明しているが、ワクチンなどによる制圧には至っていない。本研究は、クローン化した *T. orientalis* が感染した牛赤血球より精製した原虫ピロプラズムより cDNA ライブラリーを作成し、ランダムシーケンス解析により得られた 2 種類の cDNA クローン、*Tocpl* と *Toprh*、について性状解析を行ったものである。

*Tocpl*cDNA クローンは、476 個のアミノ酸配列からなる蛋白をコードする遺伝子としてクローニングされた。予想される *Tocpl* 蛋白の一次構造は、高等動物由来チオールプロテアーゼと類似しているが、酵素活性に重要な領域のシステイン残基がグリシン残基に置換しているため、酵素活性は認められなかった。Southern blot 解析や原虫ゲノムシーケンス解析の結果、原虫ゲノム中には、*Tocpl* 遺伝子に類似な遺伝子が少なくとも 5 個存在していること、*Tocpl* 遺伝子転写物がピロプラズム期に発現していることが示された。また、組み換え *Tocpl* 蛋白はヘモグロビンと結合することが確認され、*Tocpl* 蛋白が、原虫の牛赤血球内におけるヘモグロビン利用に関与していることが示唆された。

Toprh cDNA クローンは、278 個のアミノ酸配列をコードしており、アポトーシスの制御や細胞増殖に関与することが報告されている prohibitin 様分子をコードしていた。そして cDNA クローンと *Toprh* ゲノム遺伝子と比較した結果、89 塩基からなるイントロンが存在していた。*Toprh* 蛋白の予想アミノ酸配列は、*T. parva*、*T. annulata*、および *Plasmodium falciparum* の prohibitin とそれぞれ、93.8、93.1、69.1%の相同性を示した。抗 *Toprh* 血清を用いて、*Toprh* がピロプラズムで発現していることが示された。

以上、論文提出者は、タイレリア原虫の寄生・増殖に重要と考えられる2つの遺伝子を明らかにした。本研究はタイレリア原虫の増殖、寄生ならびにワクチンによる制御を考える上で重要な情報を提供している。

よって、審査員一同は、上記学位論文提出者 何 偉勇氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。