

学位論文題名

Analyses of antigenic and genetic diversities
of *Theileria sergenti* piroplasm surface proteins

(*Theileria sergenti* のピロプラズム表面抗原および
その遺伝子における多様性の解析)

学位論文内容の要旨

牛小型ピロプラズム病は *Theileria sergenti* 感染に起因する放牧病であり、日本各地の放牧地で感染症による被害の最上位を占めている。免疫学的防除法の開発が急務であるが、これらの開発にとり重要な原虫抗原の解析に関して、系統的な研究はこれまで全く行われていない。日本に分布する本原虫の免疫学性状を明らかにするために、本研究ではモノクローナル抗体(MoAb)及びDNAプローブを用いて *T.sergenti* 日本分離株の多様性とピロプラズム主要表面抗原の解析を試みて、以下の結果が得られた。

1) *T.sergenti* 福島株に対する MoAbs を作製し、これらの抗体と千歳株に対する MoAb のパネルを用いたウェスタンブロットより、日本国内で分離された *T.sergenti* 株の抗原性状を調べた。これらの MoAbs はピロプラズム主要表面抗原蛋白質である 23 あるいは 32 キロダルトン蛋白質 (p23 および p32) と強く反応した。国内分離株 17 株と MoAb 6 種との反応パターンは株間で異なっており、*T.sergenti* の抗原多様性が明らかとなった。しかし、地域による抗原型の偏りは認められなかった。ピロプラズム p23 の N-末端アミノ酸配列解析では新得、千歳株での間で差異が見られた。p23 の N-末端アミノ酸配列は p32 の cDNA から予想されたアミノ酸配列中には見出せないことから、p23 は p32 の断片ではないことが示

された。p32のcDNAプローブを用いたサザンブロットハイブリダイゼーションの解析では*T. sergenti* p32遺伝子の分離株間における多様性も示された。

2) 多様性に富む表面抗原p32の性状をさらに調べるために、p32を認識するMoAbsを用いた本分子上のエピトープ解析を行なった。競合酵素抗体法(ELISA)の結果ではp32上においてエピトープが3種類以上存在することが明らかとなった。Two-site ELISAではp32にエピトープの繰り返しがあることが示唆された。抗原の過ヨウ素酸処理後、一つのMoAbとの反応性が消失したことから、この抗体の認識するエピトープは糖鎖構造を含むことが示された。Triton.X-114相分離ではp32が膜貫通性の表面蛋白であることが明らかとなった。これらの結果から、p32はマラリア原虫の重要表面抗原と類似な性状をもち、*T. sergenti* 分離株間の抗原解析では重要なマーカー蛋白質となることが示された。

3) 持続感染の過程におけるピロプラズム主要表面抗原であるp23とp32の蛋白質化学的ならびに免疫学的性状に変化があるかどうかをウェスタンブロットおよび二次元電気泳動により解析した。感染血液接種によりタイレリアを感染させた牛では観察期間中に得られた原虫と感染牛血清あるいはMoAbsとの間での反応パターンに変化は認められなかった。一方、スポロゾイト接種により、感染させた牛から採取された原虫では採取時期によって感染血清との反応性が異なっており、また、ある時期の原虫は特定のMoAbとの反応性を消失していた。ELISAからの結果も以上の結果と一致した。これらの結果から持続感染において抗原性の異なる原虫が出現してくることが明らかとなった。二次元電気泳動の蛋白質染色ではMoAbsと反応しない時期の原虫においても32kDaあるいは23kDa蛋白質が発現されていることが確認された。このことはMoAbsが認識するこれら分子上のエピトープに変化が起きていると考えられた。また、スポロゾイト接種牛で原虫の抗原変化が顕著であったことから、ダニ体内での発育環や赤血球侵入以前の発育ステージを経過することが原虫の多様性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操
副 査 教 授 橋 本 信 夫
副 査 教 授 神 谷 正 男
副 査 助 教 授 杉 本 千 尋

学 位 論 文 題 名

Analyses of antigenic and genetic diversities of *Theileria sergenti* piroplasm surface proteins

(*Theileria sergenti* のピロプラズム表面抗原および
その遺伝子における多様性の解析)

牛小型ピロプラズマ病は *Theileria sergenti* 感染に起因し、被害の大きい放牧病であり、その防除法の開発が急務とされている。本論文は主要表面蛋白質に対するモノクローナル抗体(MoAb)及びcDNAプローブを用いて日本の分離株の遺伝的ならびに抗原的多様性を解析し、得られた新知見について述べたものである。

T. sergenti ピロプラズム主要表面抗原である23あるいは32キロダルトン蛋白質(p23, p32)に対するMoAbのパネルを用い、日本各地の分離株の抗原性を比較した。その結果国内分離株間における主要表面抗原の多様性が明らかとなった。p32のcDNAプローブを用いたサザンブロット法による解析では分離株間におけるp32遺伝子の多様性も示された。競合酵素抗体法により、p32のエピトープ解析を行った結果、p32上においてエピトープが少なくとも3種存在し、さらに繰り返しおよび糖鎖構造を含むエピトープのあることが示唆された。p32は膜貫通性の表面蛋白質であり、*T. sergenti* 分離株間の抗原解析では重要なマーカーとなることが示された。

次に持続感染の過程におけるp23とp32の免疫学的変化について検討した。感染血液接種によりタイレリアを感染させた牛では観察期間中に得られた原虫と感染牛血清あるいはMoAbとの間での反応パターンに変化は認められなかった。一方、スポロゾイト接種により感染させた牛から採取された原虫では採取時期によって感染血清との反応性が異なっており、また、ある時期の原虫では特定のMoAbとの反応性が消失していた。この結果は、持続感染において抗原性の異なる原虫が出現してくること、およびダニ体内での発育環を経過することが原虫の多様性発現に特に重要であることを示唆している。

この研究はこれまで系統的な研究が全くなされていなかったタイレリア原虫の多様性を抗原および遺伝子レベルで明らかにしたものであり、その感染症に対する免疫学的防除法の開発にとり重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は庄 文忠氏が博士（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。