

昆虫型アフリカトリパノソーマ由来細胞接着分子の同定

櫻井 達也, 井上 昇, 杉本 千尋

(帯広畜産大学・原虫病研究センター・先端予防治療学分野)

Identification of adhesion molecule expressed at the insect stage of an African trypanosome

Tatsuya SAKURAI, Noboru INOUE and Chihiro SUGIMOTO

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, National Research Center for Protozoan Diseases, Research Unit for Advanced and Preventive Medicine)

SUMMARY

Trypanosoma congolense, a causative agent of animal African trypanosomiasis, is biologically transmitted by tsetse flies (*Glossina* spp.). The parasite undergoes cell differentiation during its lifecycle. Among three cell differentiation stages in the tsetse fly, only the epimastigote form (EMF) shows an adherent phenotype. It has been reported that cell adhesion of the EMF is a fundamental process for progression of its differentiation to the animal-infective metacyclic form. Recently, we found that the culture supernatant of the EMF contained a molecule involved in cell adhesion, and we tentatively named it trypanosome-derived cell adhesion molecule (TAM). Molecular mass of native TAM was 100 kDa. Adhesion activity of the native TAM was totally inhibited by heat (65 and 100°C), sodium periodate and proteinase K treatment. The full-length TAM gene (2,067 bp) was successfully cloned from an EMF cDNA library. TAM appeared to be localized on the cell surface of the EMF and the flagellum of the bloodstream form. According to the results of a BLAST search, TAM appears to be a new *T. congolense* protein. TAM appears to be a novel glycoprotein that is expressed on the EMF cell surface and is involved in cell adhesion processes in the EMF.

[目的] *Trypanosoma congolense* (Tc)は生活環の過程で、血流型 (BSF)、プロサイクリック型 (PCF)、エピマスティゴート型 (EMF)、メタサイクリック型 (MCF)の順に分化する。BSF は哺乳類宿主の血流中に寄生し、血管内皮細胞上に弱く接着して増殖する。ツェツェバエの吸血時に取り込まれた BSF は中腸内で PCF に分化する。PCF はツェツェバエの中腸内で自由遊泳しながら増殖するが、PCF から分化した EMF はツェツェバエの口吻内腔に強く接着し、コロニーを形成して増殖する (Evans et al., 1979)。EMF から MCF へと分化した虫体が再び口吻内腔へ遊離し、ツェツェバエの吸血時に新たな宿主へ感染する。EMF から MCF への細胞分化は特にメタサイクロジェネシスと呼ばれ、メタサイクロジェネシスの進行には EMF が口吻内腔へ接着することが必須である。我々は PCF 培養系に、EMF 培養上清を添加すると本来遊泳性の PCF がフラスコ底面に強力に接着す

ることを発見した。接着した PCF は EMF へ分化することなく、最終的にはすべて死滅したが、EMF 培養上清中には何らかの細胞接着因子が存在することが明らかとなった。そこで EMF 培養上清に含まれる PCF 接着物質を Trypanosome derived cell Adhesion Molecule (TAM) と命名し、TAM の生化学性状解析、遺伝子クローニング、および局在部位の解析を行った。

[材料と方法] トリパノソーマ株はツェツェバエ体内の全発育ステージが培養可能な Tc IL3000 株を使用した。天然型 TAM は EMF の培養上清から60%飽和硫酸塩析法で粗精製した。粗精製 TAM をマウスに免疫して抗 TAM 血清を作製した。免疫沈降は [³⁵S]-MetでEMFを代謝標識して行った。TAM 遺伝子クローニングは EMFcDNAライブラリーを抗 TAM 血清でイムノスクリーニングして行った。TAM 遺伝

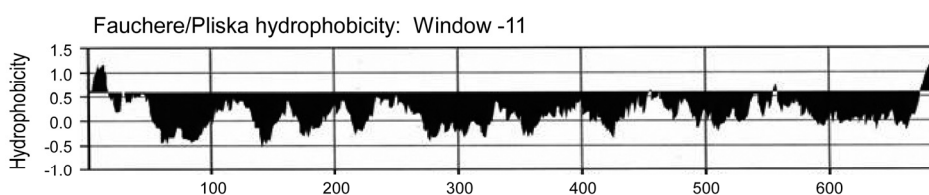


図1: TAM予想アミノ酸配列の疎水性領域予測

子から予想されるアミノ酸配列をもとに遺伝子解析プログラム (MacVector) を用いてTAM の生化学的性状を予測した。組換えTAM (Δ TAM) はGST融合蛋白質として発現し、マウスに免疫して抗 Δ TAM血清を作製した。抗 Δ TAM血清は間接蛍光抗体染色に用い、共焦点レーザー顕微鏡観察によってTAMの局在部位と発育ステージによる発現パターン解析を行った。

[結果と考察] EMF の代謝標識と抗 TAM 血清を用いた免疫沈降の結果、天然型 TAM の分子量は100 kDaであることが明らかとなった。天然型 TAM は熱処理 (65°C及び100°C)、過ヨウ素酸ナトリウム処理およびプロテアーゼ K 処理によって、接着活性を失った。したがって TAM の立体構造と糖鎖が接着に関与することが示唆された。クローニングした TAM 遺伝子は全長 2,070 bp で、高い相同性を示す既知の

遺伝子は存在しなかった。予想アミノ酸配列から、TAM の分子量は72.9 kDa、アルファヘリックス構造に富み、非常に親水性が高く、N 末端にはシグナル配列、C 末端には GPI アンカー付加あるいは膜貫通領域と思われる疎水性アミノ酸領域が存在することが予測された (図1)。局在部位と発現パターン解析の結果、TAM は EMF の細胞表面に強く、BSF の鞭毛には弱く発現していることが明らかとなった。今後 TAM が EMF の接着に必須であることを証明し、TAM 遺伝子発現調節メカニズムを明らかにできれば、メタサイクロジェネシスの分子メカニズム解明への寄与や、伝播阻止ワクチンとしての応用が期待できる。

[文献]

Evans DA, Ellis DS and Stamford S. (1979) J Protozool. 26(4): 557-63.