

令和 2年 3月

近藤陽子 学位論文審査要旨

主 査 景 山 誠 二
副主査 尾 崎 米 厚
同 林 眞 一

主論文

Molecular cloning and characterization of plerocercoid-immunosuppressive factor from *Spirometra erinaceieuropaei*

(マンソン裂頭条虫由来のプレロセルコイド免疫抑制因子の分子クローニングと特性)

(著者：近藤陽子、伊藤大輔、蓼本早百合、伊丹菜菜瀬、西方修馬、高島英造、
坪井敬文、福本宗嗣、大槻均)

令和2年 Parasitology International 掲載予定

参考論文

1. Alternative activation of macrophages in mice peritoneal cavities and diaphragms by newborn larvae of *Trichinella spiralis*

(旋毛虫の新生幼虫によるマウス腹腔と横隔膜のマクロファージの代替的活性化)

(著者：伊丹菜菜瀬、近藤陽子、蓼本早百合、伊藤大輔、福本宗嗣、大槻均)

令和2年 Yonago Acta Medica 63巻 34頁～41頁

2. Reliability and validity of the alcohol use disorders identification test - consumption in screening for adults with alcohol use disorders and risky drinking in Japan

(日本でのアルコール使用障害と危険な飲酒について成人のふるい分け検査におけるアルコール使用障害同定テスト-簡易版の信頼性と妥当性)

(著者：尾崎米厚、猪野亜朗、松下幸生、樋口進、近藤陽子、金城文)

平成26年 Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 15巻 6571頁～6574頁

学位論文要旨

Molecular cloning and characterization of plerocercoid-immunosuppressive factor from *Spirometra erinaceieuropaei*

(マンソン裂頭条虫由来のプレロセルコイド免疫抑制因子の分子クローニングと特性)

マンソン裂頭条虫は、イヌやネコを終宿主とする寄生虫でプレロセルコイド（幼虫）はヒトを含む多くの哺乳類で幼虫移行症を引き起こす。幼虫は宿主の組織内に寄生するが、局所に激しい炎症反応を引き起こさないことから、マンソン裂頭条虫が免疫抑制因子を分泌し、宿主の免疫反応を修飾しているという仮説を立てた。マンソン裂頭条虫幼虫の培養上清（排泄・分泌物質）は免疫抑制作用を持ち、その中からマクロファージの一酸化窒素産生を抑制する作用を持つ糖タンパク質を精製し、プレロセルコイド由来免疫抑制因子（P-ISF）と命名された。本研究では、P-ISFの分子クローニングを行い、その特性について解析を行った。

方法

精製したP-ISFを用いたアミノ酸解析によりN末端と内部のそれぞれ10アミノ酸を決定した。それを基にdegenerate PCRとRACE法を用いてP-ISF遺伝子全長のcDNAおよびgDNAの塩基配列を決定した。これを元にコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて分子量の異なる3種類の遺伝子組換えタンパク質（rP-ISF）を作製し、マウスに免疫して抗血清を作製した。成虫と幼虫の虫体をホモジナイズ後、タンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法によって、発育ステージ別にP-ISFの発現を解析した。また、幼虫の切片標本を作製し、間接蛍光抗体法を用いて染色することで虫体内の局在を解析した。rP-ISFの生理活性については、マウスマクロファージ（RAW264.7細胞）にそれぞれのrP-ISFを添加した後、リポポリサッカライド（LPS）で刺激した時の一酸化窒素（NO）の産生量でマクロファージの活性に対する影響を評価した。

結果

P-ISF遺伝子の全長である1,443 bpのコード配列を含む5,205 bpの塩基配列を決定したが、相同性のある既知の遺伝子は発見できなかった。アミノ酸配列から、シグナルペプチドと内部にフィブロネクチンⅢ型ドメイン（FN3）を持つことが推測された。FN3の前後にはシ

ステインを多く含む機能未知の領域が存在し、Cestoda cysteine-rich domain (CCD) と名付けた。2つのCCDはアミノ酸が62%一致し、特にシステインの位置と数は完全に一致していた。ホモロジー検索では、CCDは広節裂頭条虫の機能未知のタンパク質と相同性を示した。

作製したrP-ISFはいずれもLPS刺激したマクロファージのNO産生を抑制しなかったが、rP-ISFをマウスに免疫したところ虫体由来のP-ISFを認識する特異抗体が得られた。P-ISFのmRNAとタンパク質は、幼虫期にのみ発現し、成虫期には発現していなかった。また、幼虫の切片を間接蛍光抗体法で染色し観察したところ、P-ISFは虫体の頭部、体部に問わず柔組織全体に局在し、表皮を通過して宿主体内に分泌されることが推察された。

考 察

塩基配列からP-ISFは、既存のどの遺伝子とも類似しない新規の免疫抑制因子であることが示唆された。アミノ酸配列では、CCD部分が広節裂頭条虫のタンパク質と相同性があり、裂頭条虫類に共通の免疫抑制機構が存在する可能性が考えられた。

P-ISFが腸管内寄生する成虫では発現せず、幼虫期に発現するのは、組織内寄生して免疫に暴露されやすい環境に適応・生存するために必要な物質であるためであると考えられた。

糖鎖修飾のないコムギ胚芽タンパク質合成系で作製したrP-ISFは、虫体由来のP-ISFを認識する抗体は産生できたが、生理活性は見られなかった。この結果からP-ISFの免疫抑制作用には糖鎖修飾が重要であることが示唆された。今後、昆虫細胞や哺乳動物細胞など糖鎖修飾が可能な系で組換えタンパク質を作製し、さらなる解析に用いる予定である。

結 論

P-ISFはマンソン裂頭条虫由来の糖タンパク質で、マクロファージのNO産生を抑制する。分子クローニングにより決定された塩基配列から、新規の免疫抑制性因子である可能性が示唆された。また、P-ISFは、組織内寄生する幼虫期に虫体内で産生され、宿主体内へ分泌されることが推察された。今後は、生理活性を持つrP-ISFを作製し、さらなる機能解析を行う予定である。