

氏名(本籍)	うち内 だ田 たつ達 や也
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農博第 490 号
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 畜産学専攻
学位論文題目	ニワトリコクシジウムの宿主細胞認識に 関する研究

論文審査委員(主査)	教授	扇元敬司
	教授	伊藤敏敏
	教授	鈴木惇
	助教授	中井裕

論文内容要旨

第1章 序論

俗称コクシジウムと呼ばれる真核微生物 *Eimeria* は、宿主消化管の細胞内に寄生して出血性腸炎を主徴とした疾病を引きおこし、特に家禽産業に大きな経済的損失を与える病原微生物である。本微生物は宿主消化管の上皮から粘膜下組織において、無性および有性世代から構成される複雑な生活環を営む (図1)。感染はスポロゾイトの宿主粘膜上皮細胞への接触によって始まるが、その際、宿主細胞分子との間に特異的な相互作用が働くことが示唆されている。

細胞侵入におけるスポロゾイトと宿主細胞の分子的関連の研究はおもに *in vitro* での侵入阻害を指標として行われており、宿主細胞を酵素や陽イオン、レクチン、モノクローナル抗体で処理した場合およびスポロゾイトをモノクローナル抗体で処理した場合に細胞への侵入阻害が観察されている。また、これらの研究によりN-アセチルグルコサミンまたはシアル酸を含む、負電荷を持った37kDaの宿主細胞表面分子および24kDaのスポロゾイト表面分子が微生物と宿主間の接着に関与することが示唆されている。

本研究ではスポロゾイトの表面分子が宿主細胞膜上の分子を認識することによって、宿主細胞への接着が起こり、感染が開始するという仮説を立て、宿主細胞認識に関与する微生物分子を明らかにすることを目的とした。

第2章 *in vitro*における *Eimeria tenella* 宿主細胞認識の検索

Eimeria が宿主細胞を認識することを確認するために、各種動物細胞培養系において *E. tenella* の発育を観察した。

1. 各種動物細胞培養系における *E. tenella* の発育

ニワトリ (PCK)、ハムスター (BHK-21)、ウシ (CKT-1)、サル (Vero)、ウサギ

(RK-13)の腎臓細胞を用いて、スポロゾイト接種による*E.tenella*のin vitro培養を行った(図2)。その結果、細胞種により最終到達ステージが異なり、PCK以外では完全な発育は支持されなかった(表1)。PCK以外の細胞では、BHK-21およびRK-13において初代成熟シゾンまでの発育が確認されたが、前者では成熟シゾンの形態に変化を起こすものも認められた(図3)。以上の結果より、*E.tenella*の発育に対するそれぞれの細胞の適性順位、すなわちPCK、RK-13、BHK-21、CKT-1およびVeroが示された。

2. 各種動物細胞培養系における初代シゾン形成

各種動物細胞における初代シゾンの形成数を測定した結果、PCKおよびRK-13でほぼ同数の初代成熟シゾンおよび多核シゾンが観察され(表2)、これらの細胞が*E.tenella*の発育に適していることが再確認された。形成されたシゾンの総数を比較するとPCK、RK-13、BHK-21、MDBK(ウシ腎臓細胞)およびMA-104(サル腎臓細胞)の順となり発育適性順位と同様の結果を示した。細胞内に侵入したスポロゾイトは少なくとも初代未成熟シゾンまで発育することから、この順位はスポロゾイトの侵入数を反映していると考えられ、スポロゾイトが発育に適した細胞を認識して侵入することが示唆された。

第3章 抗*Eimeria tenella*モノクローナル抗体による分子間相互作用の検索

侵入過程において宿主細胞認識に働く分子間相互作用を明らかにするために、in vitroでスポロゾイトの細胞侵入を阻害する抗*E.tenella*スポロゾイトモノクローナル抗体を用いて侵入に関与するスポロゾイト分子の検索を行い、宿主細胞分子との結合作用について検討した。

1. 抗*E.tenella*モノクローナル抗体の認識抗原の検索

本研究室において作製され、in vitroでの細胞侵入阻害作用が確認され

ている12クローンの抗*E.tenella* スポロゾイトモノクローナル抗体KC-1~KC-12について認識抗原の局在と分子量を検索した。その結果、抗原は*E.tenella* スポロゾイトの表面に存在し、分子量は25kDaであった(図4)。また、12クローンの抗体は同一の抗原を認識していると考えられたため、以降の実験には最も侵入阻害率の高いKC-1抗体を用いることとし、本抗体の認識するスポロゾイト抗原をKC-1抗原と呼ぶこととした。

2. *E.tenella* スポロゾイトと宿主細胞間の結合作用の検索

蛍光抗体法、ウェスタンブロッティング、ELISAにおいて宿主細胞(PCK)抽出物による抗体反応阻害試験を行った。その結果、いずれの実験系においてもPCK抽出物によってKC-1の反応は阻害され(図5)、KC-1抗原が宿主細胞分子と結合することが示された。以上の結果より、KC-1抗原はスポロゾイト表面分子として宿主細胞への結合に関与することが明らかとなり、この分子間の結合作用が本微生物の宿主細胞認識の重要な機構の一つであることが示唆された。

第4章 *Eimeria tenella* 宿主細胞結合分子の性状解析

宿主細胞認識に関与するスポロゾイト分子の性状を明らかにするために、KC-1抗原のエピトープ解析、免疫アフィニティーカラムによるKC-1抗原の分離および分離したエピトープの性状解析を行った。

1. KC-1抗原のエピトープ解析

スポロゾイト分子の結合にあずかる構造を検討するため、過ヨウ素酸処理による抗体反応の消長をウェスタンブロッティングにおいて観察した。その結果、スポロゾイト粗抽出物において25kDaバンドとして示されるKC-1抗原は、過ヨウ素酸処理によってKC-1抗体と反応しなくなり(図6)、抗体と結合するKC-1抗原のエピトープに糖が含まれることが

明らかとなった。

2. KC-1抗原の分離および性状解析

KC-1抗体をプロテインA-アガロースに架橋剤を用いて共有結合させた免疫アフィニティーカラムにより、オーシスト粗抽出物からKC-1抗原を精製した（図7）。カラム精製抗原はELISAでは陽性反応を示したが、これをSDS-PAGEに供したところ、CBBによって染色されるポリペプチドは見られず、ウェスタンブロッティングにおいても抗体反応が検出されなかった。カラム精製前のKC-1抗原ではSDS-PAGEでポリペプチドの存在が示されていたことから、カラム精製によって抗体結合に関与しないポリペプチド部分が切断されたものと考えられた。また、カラム精製抗原はC4逆相クロマトグラフィーのアセトニトリル溶出系（220nm検出）において水とほぼ同時期にピークを示し（図8）、高い親水性を持つことが示された。以上のことから、本抗原は糖を多く含むものと考えられた。

本抗原の含有糖の組成を知るために、シアル酸および中性糖について呈色反応による検出を試みた。その結果、本抗原にシアル酸は含まれず、おもに中性糖が含まれることが示された（表3）。

分離した抗原分子はゲル濾過法（215nm検出）によって3つの画分に分かれ（図9）、この3画分の中では分子量の最も小さな約7kDaの画分が最も高い抗原性を示した（表4）。¹H NMR分析において、この抗原画分は量的には少ないものの3.5ppm付近に糖骨格に特徴的なスペクトルを示し、1.44、1.91、2.06、2.38ppmにペプチド骨格のメチル基由来と思われるシングレットピークを示したことから、糖ペプチドであることが強く示唆された（図10）。以上の結果より、KC-1抗原は*E.tenella* スポロゾイト表面に存在する糖ペプチドであることが明らかとなった。

第5章 *Eimeria* スポロゾイト表面の糖分子の検索

スポロゾイト表面における糖分子の存在をレクチンの結合性によって

観察した。

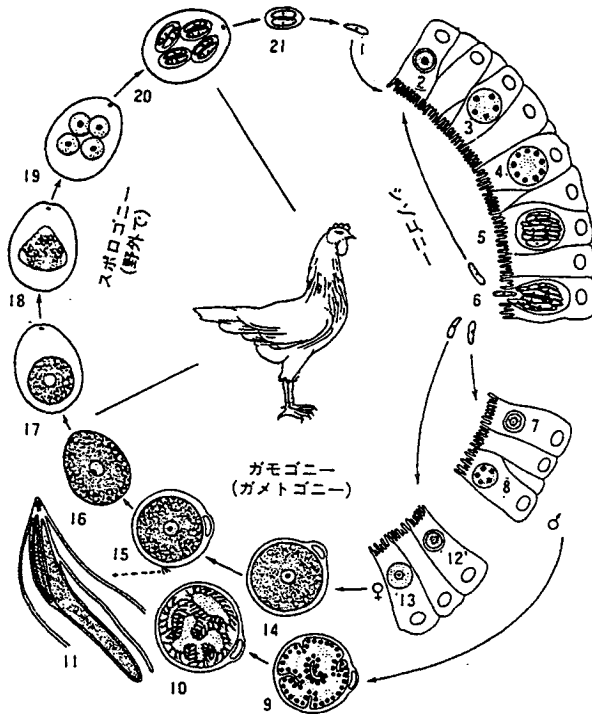
E.tenella、*E.acervulina*、*E.brunetti*、*E.maxima*、*E.necatrix* の塗沫風乾スポロゾイトに Con A、SBA、WGA、DBA、UEA I、RCA120、PNA を反応させた結果、*E.tenella* では Con A、*E.brunetti* では WGA、*E.maxima* では Con A および PNA との表面反応が観察された (表5)。今回使用したレクチンでは *E.acervulina* および *E.necatrix* に表面反応は認められなかった。以上の結果は、ニワトリコクシジウムのスポロゾイトが種によって異なる表面糖鎖を発現していることを示唆しており、これらの糖鎖が *E.tenella* のスポロゾイトと同様に宿主細胞認識に関与し、種によって異なる感染細胞を決定する要因となるものと考えられた。

第6章 総括

本研究では真核微生物 *E.tenella* の宿主細胞認識に関与する分子を明らかにすることを目的とし、第2章では到達ステージを指標として異なる動物細胞に *E.tenella* の発育適性順位をつけ、適性の高い細胞では細胞内に確認される個体数も多いことを示した。第3章ではスポロゾイト表面に 25kDa の細胞侵入関連抗原が存在し、宿主細胞との結合作用を持っていることを明らかにした。第4章ではその抗原の結合作用が糖によるものであることおよび結合分子が糖ペプチドであることを明らかにした。また、第5章では *E.tenella* 以外のニワトリコクシジウムのスポロゾイト表面における糖の存在を明らかにした。以上の結果より、ニワトリコクシジウムはスポロゾイト表面の糖分子の結合作用により、発育に適した細胞を認識して侵入するという感染モデルが予想された。

本研究によって *E.tenella* の宿主細胞認識に関与する糖分子の存在が初めて明らかにされた。本研究は赤痢菌、病原性大腸菌などの腸管由来病原性細菌をも含めた、微生物の宿主認識機構の解明に重要な知見となるものと思われる。また、本分子および類似の分子を用いた、コクシジウムおよび病原性細菌感染の防除が可能であり、今後のワクチン開発の標的となるものと考えられる。

図1 ニワトリコクシジウムのライフサイクル



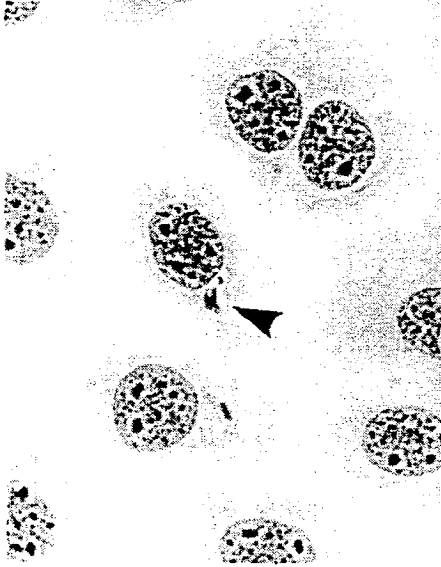
1: スポロゾイトの感染 2-6: ニワトリ腸管内での無性増殖
 7-11: ミクロガメート形成 12-14: マクロガメート形成 15: 受精
 16: ザイゴート (新生オーシスト) 17-20: 胞子形成
 21: スポロシスト [Ogimoto, 1989]

表1 in vitro培養におけるE.tenellaの最終到達ステージ

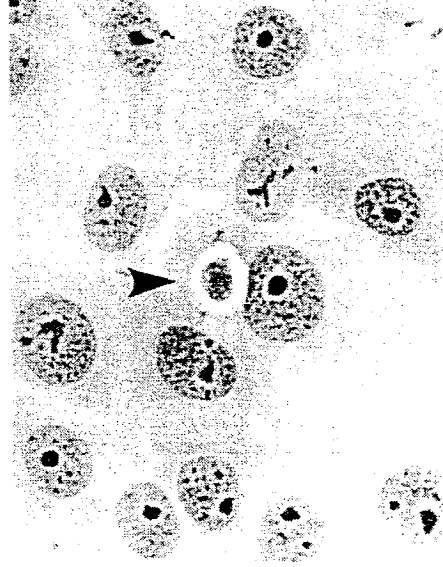
細胞	ステージ
PCK	オーシスト
BHK-21	初代成熟シズント
Vero	初代未成熟シズント
CKT-1	初代未成熟シズント
RK-13	初代成熟シズント

図2 *in vitro*培養における*E.tenella*の発育ステージ

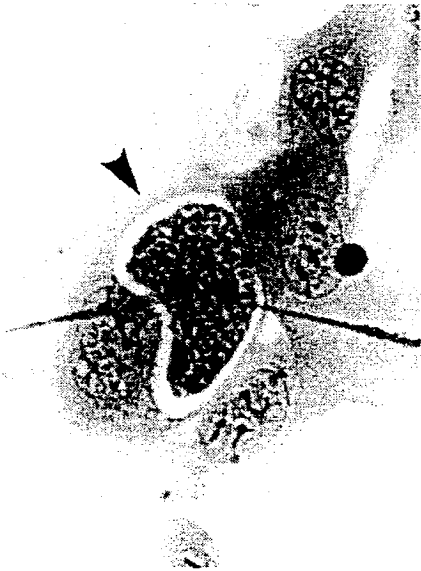
A: 細胞内に侵入したスポロゾイト
CKT-1 ×200



B: 初代未成熟シゾン
Vero ×200



C: 初代未成熟シゾン (多核体)
BHK-21 ×200



D: 初代成熟シゾン
RK-13 ×200

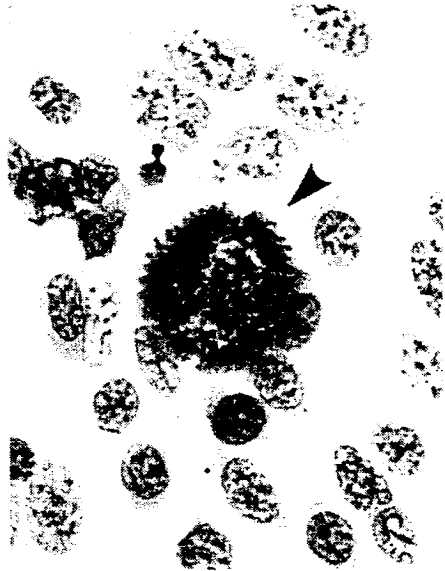


図3 形態変化を起こした初代成熟シゾン
BHK-21 ×200

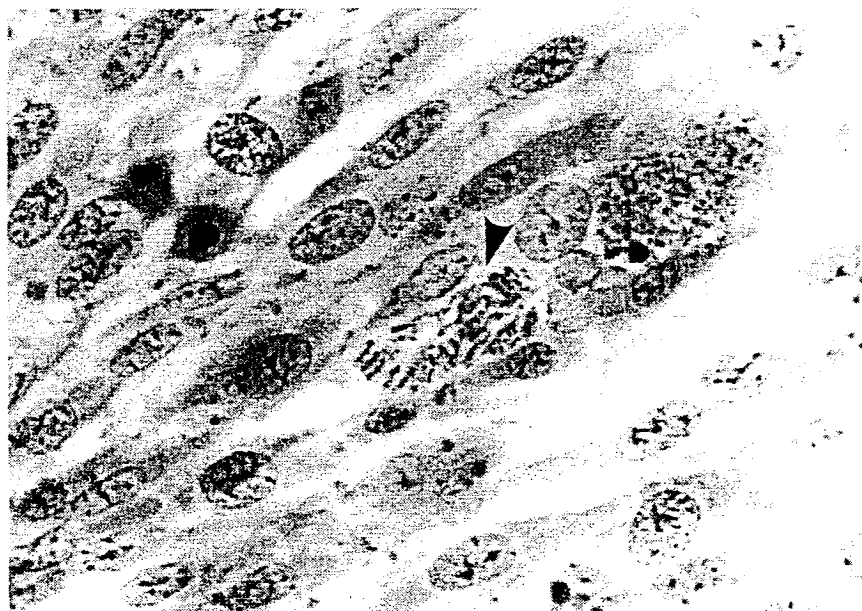
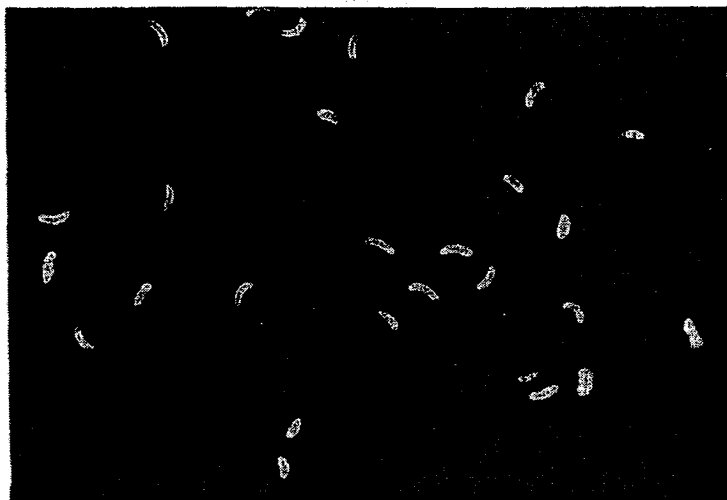


表2 in vitro培養における*E.tenella*のシゾン形成数
(×200, 20視野での総数)

細胞	シゾン形成数		
	未成熟	多核体	成熟
PCK	10	9	10
BHK-21	7	0	0
MA-104	4	0	0
MDBK	4	0	0
RK-13	12	1	11

図4 抗*E.tenella* スポロゾイトモノクローナル抗体KC-1~KC-12の認識抗原

A: KC-1による*E.tenella* スポロゾイトのIFA像



B: KC-1~KC-12による*E.tenella* スポロゾイト粗抽出抗原のウェスタンブロッティング像

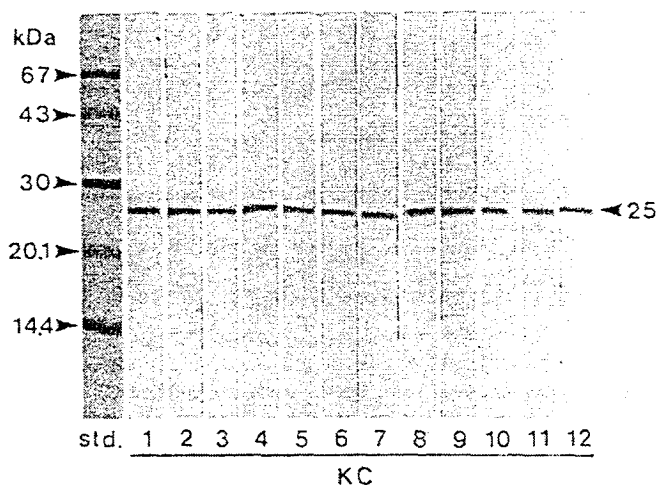
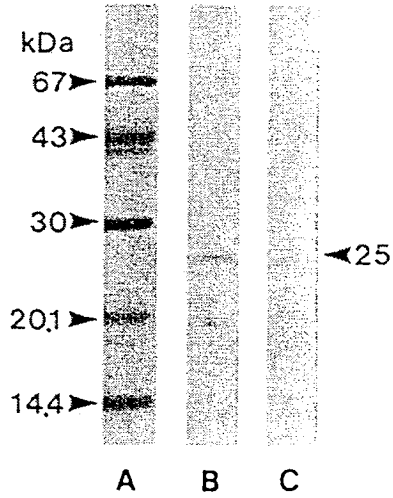


図5 PCK抽出物によるKC-1抗体反応阻害試験

A: ウェスタンブロッティング



A: 分子量マーカー B: 無処理 C: PCK処理

B: ELISA

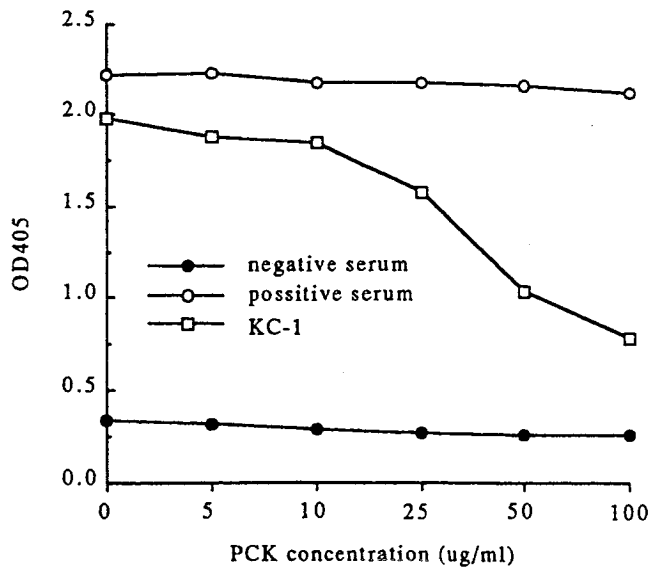
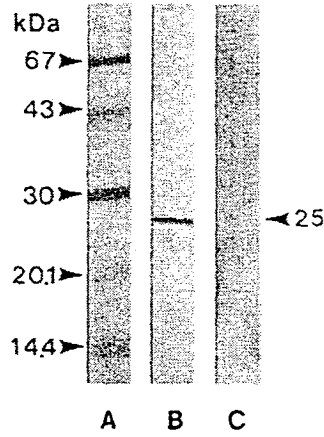


図6 過ヨウ素酸処理によるKC-1抗体反応の消長



A: 分子量マーカー B: 無処理 C: 過ヨウ素酸処理

図7 免疫アフィニティーカラムによるKC-1抗原の分離

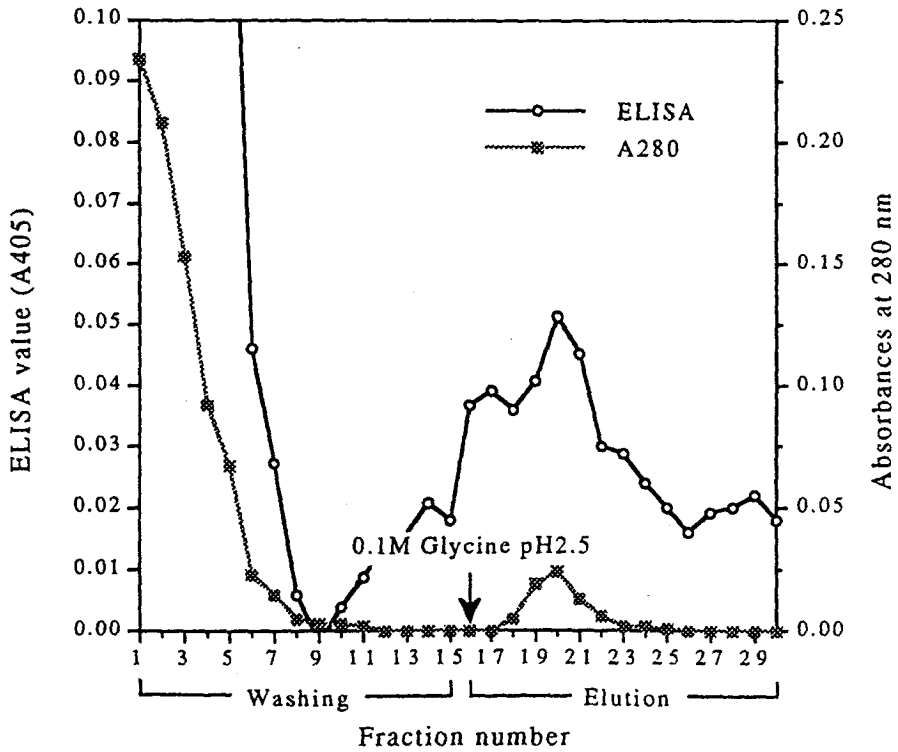


図8 KC-1抗原のC4逆相HPLC分析

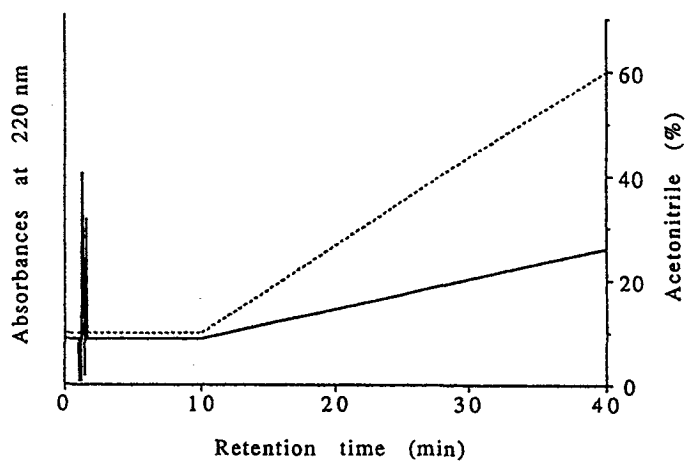


表3 KC-1抗原の含有糖

糖質	コントロール	KC-1抗原
中性糖* (A490)	0.014	0.065
シアル酸** (A580)	0.004	0.003

* : フェノール硫酸法

** : レゾルシノール塩酸法

図9 KC-1抗原のゲル濾過HPLC分析

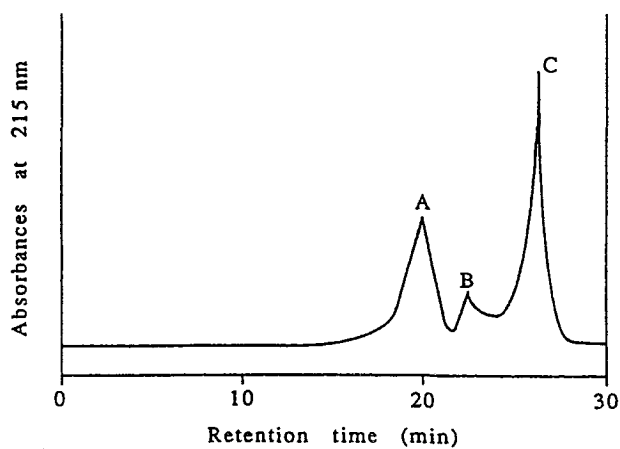


表4 KC-1抗原ゲル濾過分取画分の抗原性

画分	KC-1	コントロール
A	0.118	0.075
B	0.116	0.072
C	0.150	0.080
全分子	0.162	0.060

図10 KC-1抗原画分の¹H NMR分析

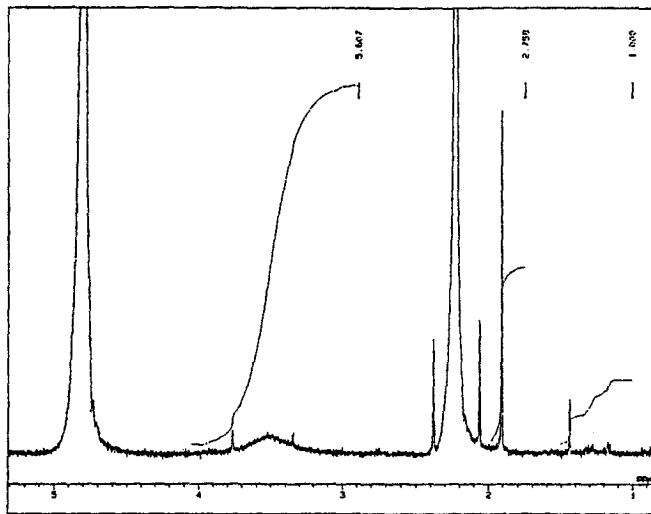


表5 ニワトリEimeria スポロゾイト表面に対するレクチンの反応性

レクチン	Eimeria 種				
	<i>E.tenella</i>	<i>E.acervulina</i>	<i>E.brunetti</i>	<i>E.maxima</i>	<i>E.necatrix</i>
Con A	+	-	-	+	-
SBA	-	-	-	-	-
WGA	-	-	+	-	-
DBA	-	-	-	-	-
UEA I	-	-	-	-	-
RCA 120	-	-	-	-	-
PNA	-	-	-	+	-

論文審査の要旨

本論文はコクシジウム原虫スポロゾイトの動物生体への侵入機作、とくにスポロゾイト表面分子が宿主細胞膜上の分子を認識して宿主細胞に接着し感染が開始されることの実証的研究である。各種動物細胞培養系における *Eimeria tenella* の発育を検索し、その結果、*E. tenella* の発育に対する各種細胞の適性順位が示され、また動物細胞培養系において形成される初代シズント数が適性順位と同様になることが示された。侵入スポロゾイトは初代未成熟シズントまで発育することから初代シズント数は、スポロゾイト侵入数を反映しておりスポロゾイトが発育に敵した細胞を認識して侵入するのであろうと推論した(第2章)。スポロゾイトの細胞侵入阻害をおこなう抗 *E. tenella* スポロゾイトモノクローナル抗体を用いて侵入過程での宿主細胞認識に働く分子間の相互作用、原虫と宿主細胞分子との結合作用を検索した。その結果、モノクローナル抗体と応答するスポロゾイト表面の抗原が宿主細胞分子と結合すること、当該抗原はスポロゾイト表面分子として宿主への結合に関与することが明らかとなり、分子間結合作用が本微生物の宿主細胞認識の重要な機構の一つであることを提示した(第3章)。宿主細胞認識に関与するスポロゾイト分子の性状を明らかにするために、抗原エピトープ解析、免疫アフィニティラムによる抗原分離および分離エピトープの解析をおこない、その結果、本抗原は糖を多く含むものと推定された。さらに本抗原の糖質部分にはシアル酸は含まれずおもに中性糖が含まれることを証明は¹H NMR 分析において量的には少ないものの 3.5ppm 付近に糖骨格に特徴的なスペクトルを示し、1.44, 1.91, 2.06, 2.38 ppm にペプチド骨格のメチル基由来と思われるシングレットピークを示した。このことから、供試モノクローナル抗体と応答する抗原は、*E. tenella* スポロゾイト表面に存在する糖ペプチドであることが明らかにされた(第4章)。さらにこの *Eimeria* スポロゾイト表面の糖分子をレクチンの結合性によって検索した。すなわち *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* のスポロゾイトに Con A, SBA, WGA, DBA, UEA I, RCA 120, PNA を反応させた結果、*E. tenella* では Con, A, *E. brunetti* では WGA, *E. maxima* では Con A および PNA との表面反応が観察された。供試レクチンでは、*E. acervulina* および *E. necatrix* に表面反応は認められなかった。これらからニワトリコクシジウムのスポロゾイトは虫種によって異なる表面糖鎖を発現していると推論し糖鎖が *E. tenella* のスポロゾイトと同様に宿主細胞認識に関与して異なる感染細胞を決定する要因となるものと考察した(第5章)。このように本研究では *E. tenella* の宿主細胞認識に関与する微生物分子を明らかにすることを目的とし、異種の動物細胞に *E. tenella* の発育適性順位をつけ、高適性の細胞では細胞内に確認される個体数が多いことが示された。またスポロゾイト表面には 25 kDa の細胞侵入関連抗原が存在し宿主細胞との結合作用を持っていることを明らかにした。そして本抗原の結合作用は糖によるものであること、また結合分子が糖ペプチドであることを明らかにした。このようにニワトリコクシジウムはスポロゾイト表面の糖分子の結合作用により発育に適した細胞を認識して侵入するという感染モデルを樹立し *E. tenella* の宿主細胞認識に関与する糖分子の存在を初めて明らかにした。本研究は病原性細菌をも含めた微生物の宿主認識機構の解明に重要な知見となり動物微生物科学の研究に大きな進歩を与えたものである。また同時に本分子を用いたコクシジウム感染の防除、類似の分子を用いたワクチン開発研究など動物疾病の防除、ひいては動物生産の拡大に寄与するものである。よって審査員一同は本論文提出者が博士(農学)の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認定した。