

## 論文の内容の要旨

論文題目 モノクローナル抗体を用いた *Toxoplasma gondii* 特異的酵素 Nucleoside triphosphate hydrolase(NTPase)の解析及びその NTPase を標的分子としたトキソプラズマ症の早期診断法の確立

氏名 菊地 たかね

## 序及び目的

トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii* 以下 *T. gondii*)は細胞内寄生原虫で、日和見感染症を起こす病原体である。ヒトを含め広範な哺乳類及び鳥類が中間宿主となり、ヒトにとっては代表的な人獣共通感染症の一つである。トキソプラズマ感染の多くは、急性感染後、獲得免疫により原虫は cyst(嚢子)を形成し不顕性感染の経過を辿るが、妊婦が *T. gondii* の初感染を受けると、tachyzoite(増殖体)が増殖して虫血症(parasitemia) を起こし、これが胎盤を通過することにより胎児に移行し流産や死産の原因となる。あるいは、網脈絡膜炎または水頭症などの奇形を伴う先天性トキソプラズマ症児を分娩することになる。また近年、HIV 感染患者や臓器移植患者等の免疫不全状態の患者では、トキソプラズマの不顕性感染が急性感染に移行し致死的なトキソプラズマ性髄膜脳炎などを起こし、これらの死亡原因となる新興再興感染症の1つとしても大きな問題となっている。

Nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase)は、ジチオスレイトール等で還元されると、ATP、GTP、CTP などのヌクレオシド三リン酸や ADP、GDP 等を基質として幅広く加水分解する。これまでに NTPase の遺伝子は *T. gondii* RH 株から同定された NTP1~NTP3 の3種類が報告されており、そのうち NTP2 は pseudogene である。NTP1 および NTP3 の遺伝子はそれぞれアミノ酸レベルで 97%の高い相同性を有している。NTPase は *T. gondii* の tachyzoite のステージには細胞の総タンパク量の 3-4%にまで発現量が上昇し、*T. gondii* が増殖する急性感染期には循環抗原として分泌されることから、免疫診断法やワクチンの標的分子の候補として考えられている。そこで、著者は、本研究でこの NTPase に着目し、第1部ではこの NTPase に特異的に反応するモノクローナル抗体(6C6)を作製し、6C6 に認識される NTPase 分子の性状および細胞内における局在そして 6C6 による侵入阻害能について調べた。さらに、エピトープマッピングにより 6C6 の認識する B 細胞エピトープの解析を行った。第2部では、急性トキソプラズマ症の際に NTPase が循環抗原として血液中に放出されることに着目し、トキソプラズマ症の早期診断法を開発する目的で、トキソプラズマ感染マウスを用いて、6C6 による sandwich ELISA 法により血液中の NTPase の動態について調べ、その有用性について検討した。

## 結果

### 第1部 抗 *Toxoplasma gondii* NTPase モノクローナル抗体(6C6)に認識される NTPase 分子の性状について

#### (1) 抗 NTPase モノクローナル抗体の性質

抗 *Toxoplasma gondii* NTPase モノクローナル抗体(6C6, IgG1)は次のようにして得た。*T. gondii* RH 株感染マウスの腹腔から回収した tachyzoite を超音波破碎し、10,000 回転で遠心後その上清を抗 NTPase モノクローナル抗体 IgA サブクラスを結合させたアフィニティーカラムで精製し、このアフィニティー精製 NTPase を BALB/c マウスに定法に従い免疫して作製した。6C6 の性状は病原性の異なる RH、Fukaya、ME49、Beverley、Nakayama の 5 株の *T. gondii* tachyzoite を用いた SDS-PAGE および Immunoblotting で解析した結果、全ての株で分子量 63 kDa のタンパクを認識した。また、6C6 の特異性について調べる目的で他の近縁の原虫の抗原を用いて同様な方法で調べた結果、他の原虫抗原と交差反応は認められなかったことから、この 6C6 は *T. gondii* NTPase を特異的に認識することが示された。

#### (2) 6C6 による NTPase Isoform の認識

さらに、6C6 を用いて NTPase を二次元電気泳動法で解析した結果、弱毒株の ME49、Beverley、Nakayama の 3 株では等電点(pI)6.0 の単一のスポットが検出されたが、強毒株である RH では pI6.0 と pI6.5 の 2 つのスポットが検出された。また、弱毒株である Fukaya では pI6.2 と pI6.4 の 2 つのスポットが 6C6 により認識された。以上の結果から、6C6 は NTPase の isoform を認識している可能性が示唆された。さらに、これらのスポットをゲルから切り出し、MALDI-TOF/MS で質量分析を行った結果、これらのスポットはいずれも *T. gondii* の NTPase であったことから、6C6 は *T. gondii* 強毒株および弱毒株における NTPase の異なる isoform を認識すると確認された。

#### (3) 6C6 による NTPase 酵素活性阻害

*T. gondii* の NTPase はジチオスレイトール等で還元された時に強い加水分解活性を示すことが特徴である。従って 6C6 がこの酵素活性に与える影響について *in vitro* で調べた。その結果、基質に ATP、ADP を用いた時の酵素活性は、加えた抗体の濃度に依存して減少した。また、6C6 の代わりに精製 NTPase で免疫したウサギのポリクローナル抗体および IgA サブクラスのモノクローナル抗体を加えた時、この酵素活性阻害能は、基質が ATP の場合には認められず、また、ADP が基質の場合でも 40%程度であった。以上のことから、6C6 は他の抗 NTPase 抗体に比較し、著しい NTPase の酵素活性阻害能を有することが明らかになった。

#### (4) 6C6 に認識される B 細胞エピトープマッピング

次に、データベースから得られた NTPase のアミノ酸配列から作製した合成ペプチドを用いて、6C6 が認識する B 細胞エピトープについて解析した。その結果、628 アミノ酸残基の 251-265 の LGEDPARCMIDEYGV のペプチドと最も強く反応し、その中でも IDEYGV が結合部位の中心であった。NTP1 および NTP3 の遺伝子は、それぞれアミノ酸レベルで 97%の高い相同性を有しており、この 6C6 に認識された 251-265 の部位は両者の共通部分であった。また、IgA サブクラスの抗体は N 末に近い

41-55 の RINVGKTHLQTLRNL(NTP1)と RINVGKKHLQTLRNL(NTP3)と反応した。さらにこの部位の 6 残基ずつ合成したペプチドと反応させた結果、この IgA サブクラスの抗体の認識部位の中心は VGKKHL であった。また、この 6 残基のペプチドには 6C6 も高い結合を示したことから、これらのペプチド部位が NTPase の活性発現において重要な部位であることが示唆された。

#### (5) 6C6 により認識される NTPase の原虫内の局在

6C6 と反応する NTPase 分子の原虫内における局在について、蛍光顕微鏡による観察を行ったところ、tachyzoite の細胞膜表面に特異蛍光が観察された。さらに詳細に解析するために 6C6 を用いて免疫電子顕微鏡で観察した結果、6C6 が認識する NTPase は tachyzoite の Surface membrane に存在していることが確認された。

#### (6) 6C6 による虫体の細胞侵入阻害

6C6 が酵素活性阻害能や細胞表面の NTPase を認識することから、6C6 の感染阻害能について *in vitro* で調べた。6C6 で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間処理された tachyzoite は、宿主細胞の Vero 細胞への侵入率が抗体濃度依存的に著しく低下した。これらのことから、6C6 が tachyzoite の細胞表面の NTPase に結合したことによって、tachyzoite の宿主細胞への侵入が阻害され、その結果宿主細胞への感染が抑制されていることが推測された。

## 第 2 部 *T. gondii* NTPase を標的分子とした Avidin-Biotin sandwich ELISA (ABS-ELISA)法によるトキソプラズマ症の早期診断法の確立

### (1) 抗 NTPase 抗体 6C6 を用いた Avidin-Biotin sandwich ELISA (ABS-ELISA)法の確立

急性トキソプラズマ症の早期診断法を開発する目的で 6C6 を capture 抗体に、また精製 NTPase を免疫したウサギから得たポリクローナル抗体を detector 抗体に用いた ABS-ELISA 法を開発し、この ABS-ELISA 法の特異性および感度について調べた。その結果、ABS-ELISA 法は *T. gondii* 抗原に特異的に反応し、また、この ABS-ELISA 法の NTPase の検出限界は 0.5 ng/ml であり、これは tachyzoite の虫体数に換算すると 5 tachyzoites に相当することが明らかになった。 *In vivo* における ABS-ELISA 法の感度を調べる目的で 1x10<sup>2</sup>個、1x10<sup>4</sup>個、1x10<sup>6</sup>個の *T. gondii* RH 株の tachyzoite を ddY マウスの腹腔内に接種した。その結果、1x10<sup>2</sup>個の場合では感染後 3 日に 11 ng/ml の NTPase、1x10<sup>4</sup>個の場合では感染後 3 日で 39 ng/ml の NTPase、そして 1x10<sup>6</sup>個を感染させた場合では感染 3 日目で約 4.5 μg/ml の NTPase が血清中に検出され、接種した虫体数と血清中の NTPase 量が比例することが推測された。その後、NTPase 量は感染マウスが死亡する直前の 5 日目まで著しく増加した。

### (2) *T. gondii* 感染マウスにおける血中 NTPase の動態

トキソプラズマ症の急性感染モデルである重度免疫不全マウス(SCID マウス)に、*T. gondii* ME49 の cyst を 20 個経口感染させ血中 NTPase の動態について調べた。マウスは感染後 12 日目から死亡し始め、20 日目までに急性感染で全例が死亡した。SCID マウスにおける血中 NTPase の動態は、感染 2 日後に 6.4 ng/ml の NTPase が検出されはじめ、4 日目には 30 ng/ml に増加し、6 日目には 10 匹全てのマウスで NTPase が検出され、その濃度も約 50 ng/ml に達した。なお、抗 *T. gondii* 抗体は全てのマウスで検出さ

れなかった。以上の結果から、SCIDのような重度の免疫不全マウスでは血中の NTPase は感染初期から出現し死亡するまで上昇することが明らかになった。

一方、慢性トキソプラズマ感染モデルとして、ddY マウスに 20 個の *T. gondii* ME49 の cyst を経口感染させ、血中 NTPase の動態について調べた。血中 NTPase は感染後 3 日目から検出され、7 日目、14 日目に顕著に検出されたが、その検出量は最高で 25 ng/ml であった。その後血中 NTPase 量は慢性感染に移行するに従い徐々に減少し消失した。一方マウスの脳内における cyst の形成は、感染の 14 日後から認められ、この時期は抗 *T. gondii* IgG 抗体の上昇の時期と一致していた。その後、抗 *T. gondii* IgG 抗体価は実験終了まで高い値で維持されていたが、血中の NTPase はほとんど検出されなかった。以上の結果から、NTPase は感染初期の急性期において検出され、IgG 抗体が上昇し、脳内に cyst が形成される慢性感染期には検出されないことが明らかになった。

### (3) Bioassay 法と parasitemia

血液中の NTPase の動態と parasitemia との関係性を調べる目的で、*T. gondii* 感染マウスの血液を正常 ddY マウスに腹腔内接種し *T. gondii* 感染の成立について調べた。その結果、NTPase 陽性の ME49 株感染 SCID マウスおよび ddY の血液中に、*T. gondii* の存在が示唆された。これらのことから、血液中の NTPase は、血流中の *T. gondii* から由来している可能性が示唆され、トキソプラズマ症の急性感染を診断する上での良い指標になることが示唆された。

### 考察

抗 *T. gondii* NTPase モノクローナル抗体 6C6 は NTPase の酵素活性を阻害し、強毒株および弱毒株の異なる等電点の NTPase の isoform を認識することができ、また、合成ペプチドを用いて行った 6C6 のエピトープ解析の結果から、6C6 が認識する部位は NTPase isoform (NTP1, NTP3) のアミノ酸配列の共通部分であることが明らかになった。また、6C6 は酵素活性に必要であると考えられる VGK を含む nucleotide binding site を認識していることから、この部分が酵素活性の発現において重要な部位であることも明らかとなった。また、6C6 により認識される NTPase は tachyzoite の細胞膜に局在し、6C6 で予め処理された tachyzoite は Vero 細胞などの宿主細胞に侵入できなくなることから、NTPase は、*T. gondii* が宿主細胞に侵入する際に重要な役割を果たしている酵素であることが示唆された。これまで、このような性質の抗 NTPase モノクローナル抗体は報告されていなかった。*Schistosoma mansoni* の ATPase は *T. gondii* NTPase と同じ apyrase family に分類されている酵素である。この酵素も細胞膜に局在しており、*S. mansoni* は虫体表面にこの酵素を出すことにより cytotoxic T cell や血小板から放出されるエフェクター因子の ATP を分解して、これらの免疫細胞からエスケープしていることが考えられている。*T. gondii* の感染においても cytotoxic T cell や血小板が、宿主の感染防御のエフェクターメカニズムに関与していると報告されていることから、*T. gondii* の NTPase も宿主の感染防御因子による攻撃から逃れるために細胞膜に局在して、周囲の ATP 等を分解している可能性があると考えられる。また、このような *T. gondii* の増殖、感染に重要な酵素である NTPase に対するモノクローナル抗体を用いて急性トキソプラズマ症の早期診断法の開発を試みた。その結果、急性 *T. gondii* 感染マウスで NTPase が容易に検出され、また、*T. gondii* 感染マウスにおいて血液中に検出される NTPase の動態と parasitemia の推移が一致していたことから、急性トキソプラズマ症の早期診断法として有用であることが示唆された。