

## 審査の結果の要旨

氏名 菊地 たか ね

本研究はトキソプラズマ原虫の増殖期虫体(tachyzoite)に特異的に存在する nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase)に着目し、この NTPase を特異的に認識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・細胞内局在および 6C6 によるトキソプラズマの宿主細胞への侵入阻害能から NTPase の機能についての解明を試みたものである。また、NTPase が急性トキソプラズマ症の際に、循環抗原として血液中に放出されることに着目し、得られた 6C6 抗体を用いた sandwich ELISA 法の開発を試み、急性トキソプラズマ症の早期診断法の開発を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 抗トキソプラズマ NTPase モノクローナル抗体(6C6)は、Immunoblotting 法により強毒株および弱毒株のトキソプラズマ原虫(RH, ME49, Beverley, Fukaya, Nakayama)の分子量 63kDa のタンパク質を認識した。さらに等電点二次元電気泳動および Immunoblotting 法で調べた結果、弱毒株の ME49, Beverley, Nakayama では等電点(pI) 6.0 の単一のスポットが検出された。強毒株の RH では pI 6.0 と 6.5 の 2 スポットが検出され、弱毒株の Fukaya 株にも pI 6.2 と 6.4 の 2 スポットが検出された。これらの各スポットは MALDI-TOF MS による質量分析の結果、いずれもトキソプラズマの NTPase と同じアミノ酸配列を持つペプチドであったことから、6C6 はトキソプラズマの強毒株および弱毒株の NTPase の isoform を認識することが明らかになった。また 6C6 は ATP および ADP を基質とする NTPase の酵素活性を抗体濃度依存的に阻害することも明らかになった。さらに、6C6 の B 細胞エピトープについて、NCBI のデータベースから合成ペプチドを作製して解析した結果、6C6 の認識する部位は NTPase isoform (NTP1, NTP3)の 623 アミノ酸残基中の 260-265 番目の IDEYGV であり、しかもこの部位の配列は NTPase と高い相同性を有する CD39 や他の apyrase family の酵素には見られないトキソプラズマの NTPase に特異的な配列部位であることが明らかになった。なお、この配列部位は酵素活性に関与すると考えられる apyrase conserved region(ACR) 3 と ACR 4 の中間に位置しており、この部位に 6C6 が結合することにより NTPase の活性が阻害されことから、これらの配列が NTPase の酵素活性発現に重要な部位であることが示された。また、6C6 を用いた免疫電子顕微鏡による解析の結果、NTPase は tachyzoite の細胞膜に局在していることを明らかにした。また感染マウス脳に形成された嚢子(cyst)には NTPase は発現していないことを免疫組織染色を用いた解析の結果明らかにした。NTPase が tachyzoite の細胞膜に局在し、かつ 6C6 は NTPase の酵素活性を阻害したことから、6C6 で処理された tachyzoite の宿主細胞へ

の侵入率を *in vitro* 調べた結果、6C6 で処理された tachyzoite の Vero 細胞への侵入率は抗体濃度依存的に阻害された。この結果から、NTPase が tachyzoite の宿主細胞侵入時に関与している分子であることが示唆された。

2. 得られた 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 Avidin Biotin Sandwich (ABS)-ELISA 法を開発し、その特異性および感度について調べた。その結果、ABS-ELISA 法はトキソプラズマ抗原に特異的に反応し、また NTPase の検出限界は 0.5 ng/ml であり、これは計算上 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、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^6$  個の RH 株 tachyzoite をマウスの腹腔に接種し血清中の NTPase 量を測定した。その結果、感染後 3 日目において  $1 \times 10^2$  個を感染させたマウス血清で 11 ng/ml、 $1 \times 10^4$  個の感染では 39 ng/ml、 $1 \times 10^6$  個の感染マウス血清中には 4.5  $\mu$ g/ml の NTPase が検出され、接種した虫体数と血清中の NTPase 量が比例することを明らかにした。トキソプラズマ症の急性感染モデルとして重度免疫不全の SCID マウスに ME49 株の cyst を 20 個経口感染させ、血中の NTPase の動態について調べた結果、感染 2 日目から 6.4 ng/ml の NTPase が検出され、その後 NTPase 量は増加し急性感染で SCID マウスが死亡するまで上昇していることを明らかにした。慢性感染モデルの ddY マウスに同様に ME49 株の cyst を 20 個経口感染させた結果、血中 NTPase は感染 3 日目から検出され、その後 7 日目、14 日目に顕著に検出される二峰性の動態を示した。この時期には Ig M 抗体が検出されたが、脳内に cyst が形成され、また高 IgG 抗体価を示す感染 21 日目以降の慢性感染期には NTPase は検出されなくなることが明らかになった。血液中に検出された NTPase の動態と parasitemia との関係を知る目的で、感染マウスの血液を正常 ddY マウスの腹腔に接種し感染の成立について判定した。その結果、NTPase 陽性の ME49 株感染 SCID マウスおよび ddY マウスの血液中にトキソプラズマの存在が示唆されたことから、血液中の NTPase は、血流中のトキソプラズマ原虫から由来していることが強く示唆され、ABS-ELISA 法による NTPase の検出はトキソプラズマ症の急性感染を診断する上で良い指標となる結果を得た。

以上、本論文はトキソプラズマ原虫の NTPase に対するモノクローナル抗体 6C6 を用いて、各株に存在する isoform、細胞内局在、NTPase の酵素活性阻害と宿主細胞侵入阻害の関係について解析し、NTPase はトキソプラズマ原虫病原性に関与する酵素であることが示唆された。このように、トキソプラズマ原虫の NTPase の特異的な性質が 6C6 抗体により初めて明らかになった。また、本研究より得られた 6C6 抗体を用い、急性期感染時におけるトキソプラズマ原虫の NTPase の動態を調べることにより急性トキソプラズマ症の新たな診断法を開発した。これらのトキソプラズマ原虫 NTPase に関する新しい知見は、この分野の研究を大きく進展させ学位の授与に値するものと考えられる。