

# 1. トリパノソーマの抗原変異

江下優樹 福間利英

(掲載決定:平成3年8月7日)

## はじめに

トリパノソーマ原虫によって引き起こされるアフリカトリパノソーマ症は、別名睡眠病とも言われる。その慢性感染の末期には中枢神経系が冒されて無気力・昏睡状態に陥る。東アフリカに多い急性のローデシアトリパノソーマ症に罹患すると、多くの患者は心障害等により数カ月で死亡する。本症は元来動物の病気である。家畜が感染すると動物性タンパク源としての用途に適さなくなるので、アフリカの浸淫地では有効な対策が待たれている。しかし、風土のあるいは生活習慣などの種々の要因とも相まって、本症の制圧は困難をきたしている。

もう一つ本症の制圧を困難にしているのは原虫の抗原変異である。本症の制圧のために、分子生物学的技術を用いた原虫の種々の特性についての解析がなされている。その中でも、トリパノソーマに分子生物学的技術の応用がなされたのはこの抗原変異の機構の解明からと言ってよい(江下, 1989; Vickerman, 1989)。

## 抗原変異とは

宿主にトリパノソーマ原虫が侵入すると、その原虫を覆う表面抗原に対する抗体が宿主内に産生される。そして、原虫が駆逐される前に抗原変異が生じて、異なる表面抗原で覆われた原虫が順次出現して、それが増殖する。そのために、先行する表面抗原に対してつくられた抗体は無効となり、感染は持続する。

トリパノソーマ原虫は、吸血性のツェツェバエ (*Glossina* spp.) によって媒介される。昆虫体内で发育する原虫は昆虫型、哺乳動物の血液内で发育するものは血流型と総称される。血流型の原形質膜は、変異性の表面糖タンパク質 (variable surface glycoprotein: VSG) で覆われている。血流型が、ツェツェバエ体内に取り込まれると、VSG を失って昆虫型のプロサイクリック型に変化する。このプロサイクリック型はさらにエピマスティゴートに変化した後に、发育終末型のメタサイクリック型 (トリボマスティゴート) になる。この型に変化すると、血流型の原虫と同じように、VSG でその表面

が再び覆われる。原虫が VSG で覆われる時、個々の原虫を覆う VSG は 1 種類からなる。血流型の VSG の種類は少なくとも 100 以上あると推定されている (Cross, 1990)。

## 分子レベルでのトリパノソーマの抗原変異

トリパノソーマ原虫の染色体には、VSG 遺伝子の保存配列となるベーシックコピー (BC) が、VSG の種類数だけ存在する。染色体の末端部はテロメアと呼ばれていて、いくつかのテロメアの部位は VSG の発現に関与している。VSG 遺伝子の発現は 3 つの様式に大別される (Cross, 1990; 福間, 1990) (図 1)。

第一の様式は、BC が染色体の内部領域にある場合で、BC とほぼ同一の配列が複製されて発現関連コピー (expression-linked copy: ELC) がつくられる。ELC は、テロメア近くの発現部位 (expression site: ES) にある遺伝子と置き換えられて活性化される。この ES には、VSG 遺伝子の他に数個の発現に関与した遺伝子 (expression site-associated genes: ESAGs) があり、一つの転写単位を構成している (Zomerdiijk, *et al.*, 1990)。この ES にある ELC が転写がされて mRNA 前駆体がつくられる。

第二の発現様式は、VSG 遺伝子がテロメアにある場合で、ELC がつくられることなく、その部位が直接活性化される。mRNA 前駆体はその部位が転写されてつくられる。

そして、第三の様式は、複数の BC のそれぞれ一部が複製されてモザイク状の ELC がつくられ、その後テロメア近くの発現部位に挿入されて mRNA 前駆体がつくられる (図 1)。Trypanosoma equiperdum を用いて活性のある VSG 遺伝子を調べたところ、3' 末端の 182 塩基の配列はサイレントな BC の部分配列からなり、その 5' 末端の配列は 2 つから 3 つのサイレントな BC の部分配列から構成されていた (Roth *et al.*, 1989)。しかも、各々のサイレントな BC の約 1500 塩基配列を調べてみると、いくつかのストップコドンが認められ、VSG 遺伝子とは異なる疑似遺伝子であった。

以上述べた 3 つの様式からつくられた mRNA 前駆体は、別の染色体にある 35 塩基からなるミニエクソンを含む配列から転写された RNA と、トランススプライシングによって、その 3' 末端に 35 塩基の配列が付加さ

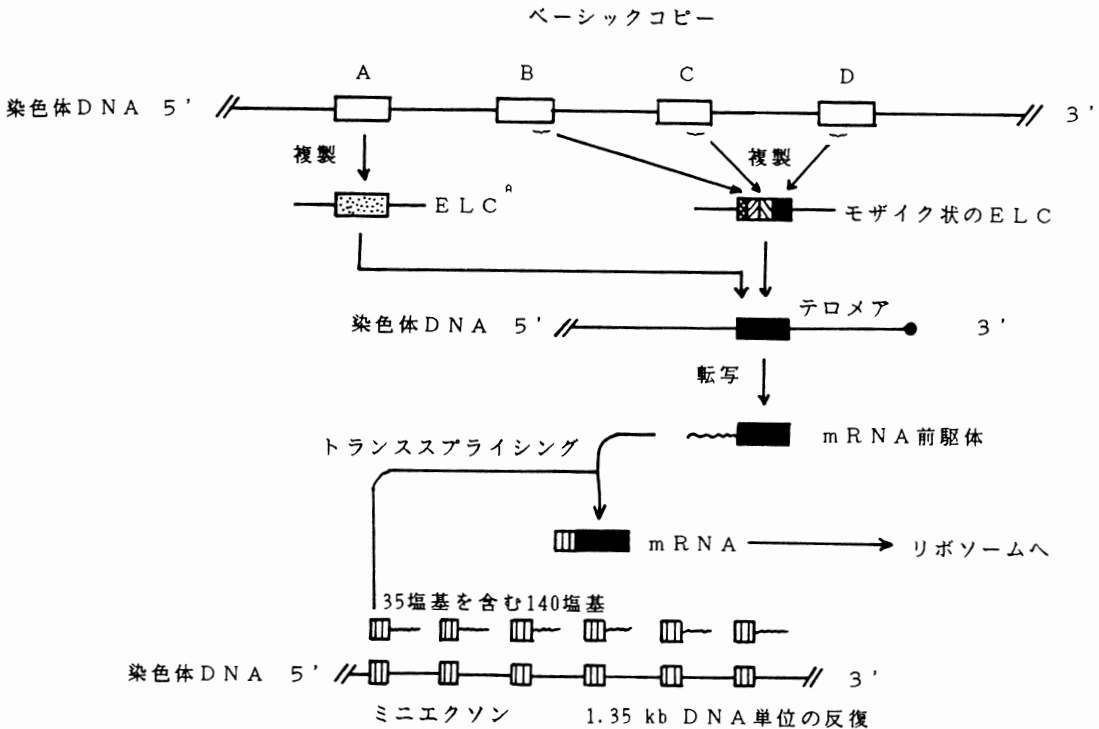


図1 変異性の表面糖タンパク質 (VSG) 遺伝子の発現様式

(トリパノソーマ原虫の染色体 DNA にあるベーシックコピー (BC) が遺伝子変換によって発現関連コピー (ELC) に複製されたのち、テロメアに挿入される。その部位が転写されて mRNA 前駆体がつくられる。mRNA 前駆体はその 5' 末端に異なる染色体上にある 35 塩基の配列をトランススプライシングによって付加されて、成熟 mRNA となる。成熟 mRNA はリボソームと結合して、タンパク質に翻訳される。)

[福間利英, 1990, 遺伝, 44 : 39を改変]

れて成熟 mRNA となる。成熟 mRNA はリボソームと結合してタンパク質へ翻訳される。その後、小胞体内腔に移り、C 末端の疎水性の部分でタンパク質は切られる。その切られた部分に、後で述べるグリコシルイノシトールリン脂質の尾をつけて、ゴルジ装置で成熟糖タンパクとなり、原虫の表面に運ばれて外表皮となる。

最近、パルスフィールド電気泳動法と CAT アッセイ法を用いて染色体の解析が進められている。テロメアにある ES を制御するプロモーターが、活性のある VSG 遺伝子と複数の ESAGs の上流に認められた (Zomerdijsk *et al.*, 1990)。またその部位のさらに上流には 50 塩基からなる繰り返し配列が見つかった。VSG 遺伝子の発現のメカニズムには、ある種の規則性があるのかも知れない。今後、分子生物学的な技術の進歩と相まって、VSG 発現のメカニズムの解明が進むことが期待される。

また、抗原変異を制御するスイッチ機構の全体像はま

だ明らかになっていないが、メタサイクリック型で発現される VSG (M-VSG) の数は血流型のそれとは異なって、ある限られた種数に集束することが知られている。このことから、メタサイクリック型での M-VSG が誘導される機構と血流型で働くスイッチ機構とは同じではないかも知れない。

### VSG のアンカリング

原虫の原形質膜と VSG がどのように結合しているかを *T. brucei brucei* を用いて調べたところ、図 2 のようにグリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidylinositol : GPI) を介して、VSG が原虫の表面膜と結合していた (Ferguson *et al.*, 1988)。このような結合は、他の寄生虫でも認められている。そしてある機能を有する表面タンパク質をも含めて、動物細胞一般に GPI が存在する事が明らかとなった。

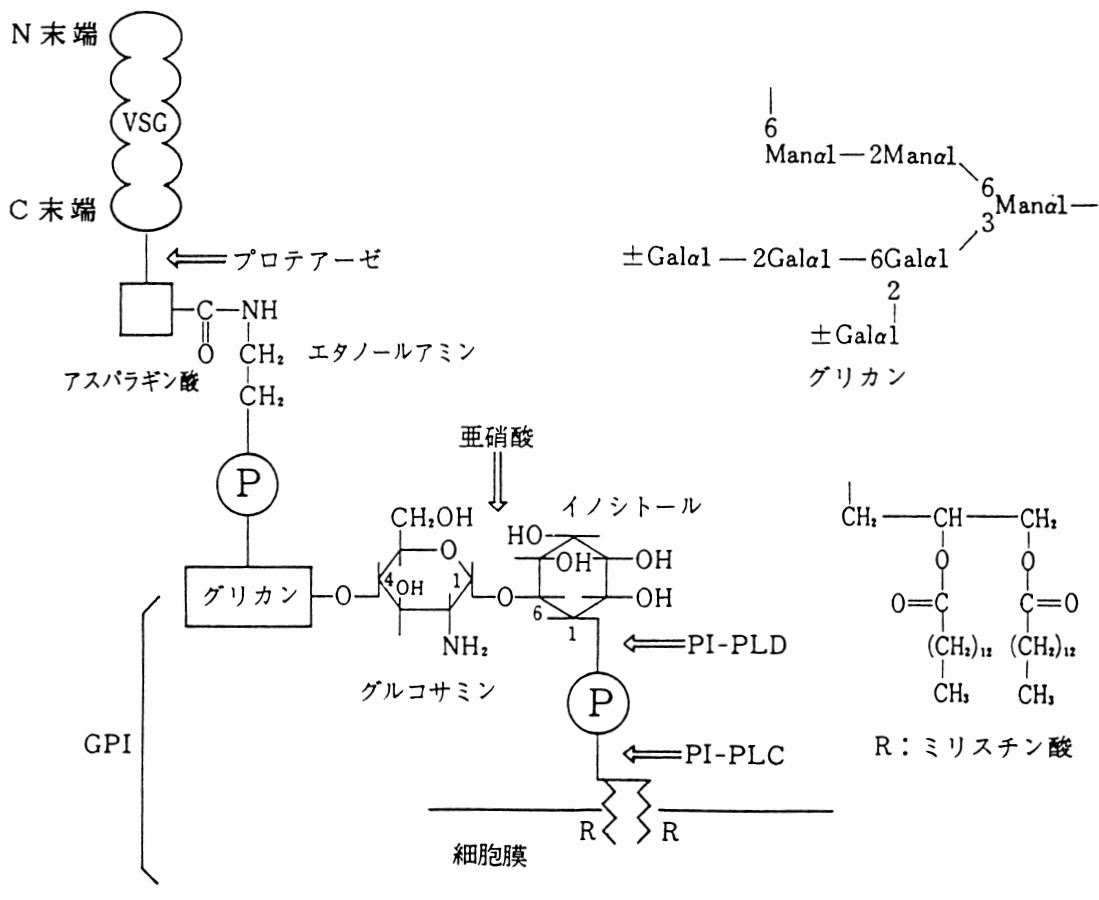


図2 GPI アンカリングを介した VSG の原虫表面膜との結合  
 (*T. b. brucei* の VSG の C 末端にエタノールアミン, グリカンそして PI の順で結合して, PI の脂  
 肪酸で原虫の細胞膜にアンカーしている。)  
 [福間利英, 1990, 遺伝 44:40を改変]

*T. b. brucei* 由来のホスホリパーゼ C は, PI を分解し VSG を遊離させることが知られている。GPI アンカリングと抗原変異との関連性は明らかではないが, 原虫表面の VSG をいち早く脱ぎ捨てるのに都合のよい構造を GPI アンカリングは与えていることが推察される。

ワクチン開発の可能性

トリパノソーマ原虫の抗原変異の多様性が, 理想的な手段としてのワクチン開発の妨げの一つとなっている。しかし, そのワクチン開発に関する我々の着目は次の点にある。すでに述べたように, その機構は不明だが, 昆虫体内でメタサイクリック型に変わった時の M-VSG は10種前後の数(1セット)に限られる(江下, 1989)。

しかも, 少なくとも同一分離株では, ツェツェバエに入った血流型の変異抗原型に関係なく, メタサイクリックの抗原型は一定のレパートリーに戻る(Cross, 1990)。

そこで, 1セットの M-VSG が株間でどの程度に異なっているかは不明であるが, このメタサイクリック型原虫が発現する数少ない M-VSG を, 前もって準備することが出来れば, 家畜やヒトをトリパノソーマ原虫の感染から未然に防ぐことができるかもしれない。

我々は, すでに試験管内でメタサイクリック型の大量培養が可能になっている *T. (Nannomonas) congolense* のクローン IL3000を用いて, M-VSG の組換え体によるタンパク質の発現を試みた。メタサイクリック型の mRNA から cDNA 発現ライブラリーをフージ・ラムダ gtl1 をもちいて構築した。あらかじめ準備してお

いたメタサイクリック型原虫の表面抗原に対する特異抗血清を用いて、cDNA ライブラリーから $7 \times 10^4$ のプラークを免疫学的にスクリーニングして、100個の抗血清陽性のファージクローンを得た。

その内の22個の組換えファージクローンをサザンブロットハイブリダイゼーションで調べたところ、異なる2種類の組換えファージクローンを得た。そのうち21個は同じ塩基配列で、他の1つは異なった配列を示した。つぎに、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行ったところ、いずれも血流型ではなくメタサイクリック型のM-VSGとのみ反応した。以上のことから、IL3000クローンから2つの異なるM-VSGを証明した(Eshita *et al.*, 投稿準備中)。

また、組換えバキュロウイルスを用いて、IL3000クローン由来のリコンビナントM-VSGを合成し、1リッターの培養液から $10^8$ 個の細胞を得て、10.3mgのタンパク質を得た。この量は動物を免疫するのに十分な量であった(浦川, 江下, 福間, 未発表)。

今後、分子生物学的な技術を応用して、これらのcDNAクローンをを用いて抗原変異のスイッチ機構を解析することと平行して、数種の抗原に対応しうるワクチンの研究・開発も追求する必要があるだろう。

#### 謝 辞

帝京大学医学部寄生虫学教室の澁谷敏朗教授、長崎大学熱帯医学研究所原虫学部門の神原廣二教授、化学及血清療法研究所の浦川豊彦博士、兵庫医科大学免疫学・医動物学教室の宮本彦四郎博士から、有益な助言を得た。

#### 文 献

- 1) Cross, G. A. M. (1990): Cellular and genetic aspects of antigenic variation in trypanosomes. *Ann. Rev. Immunol.*, 8, 83-110.
- 2) 江下優樹 (1989): アフリカトリパノソーマ症の分子生物学. 遺伝子工学を用いたワクチン開発は可能か. *臨床と微生物*, 16, 521-529.
- 3) Ferguson, M. A. J., Homans, S. W., Dwek, R. A., and Rademacher, T. W. (1988): Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, 239, 753-759.
- 4) 福間利英 (1990): 熱帯原虫病の分子生物学. *遺伝*, 44, 37-42.
- 5) Roth, C., Bringaud, F., Layden, R. E., Baltz, T. and Eisen, H. (1989): Active late-appearing variable surface antigen genes in *Trypanosoma equiperdum* are constructed entirely from pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9375-9379.
- 6) Vickerman, K. (1989): Trypanosome sociology and antigenic variation. *Parasitol.*, 99, S37-S47.
- 7) Zomerdijk, J. C. B. M., Ouellette, M., ten Asbroek, A. L. M. A., Kieft, R., Bommer, A. M. M., Clayton, C. E. and Borst P. (1990): The promoter for a variant glycoprotein gene expression site in *Trypanosoma brucei*. *EMBO Journal*, 9, 2791-2801.