

トリパノソーマ病特異的診断法の開発および  
野外材料を用いた実用評価

(課題番号 13556048)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金  
基盤(B)(2) 研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 井上 昇

(帯広畜産大学 原虫病研究センター 助教授)

## はしがき

本報告書は、平成13年度から平成15年度の3年間にわたり交付を受けた日本学術振興会科学研究費補助金「基盤研究(B)(2)」(研究課題番号13556048)の研究成果をとりまとめたものである。本報告書を刊行するにあたり、ご協力を頂いた関係各位に厚く感謝する次第です。

## 研究組織

研究代表者 : 井上 昇 (帯広畜産大学 原虫病研究センター)

研究分担者 : 横山 直明 (帯広畜産大学 原虫病研究センター)

研究分担者 : 田仲 哲也 (北海道大学 大学院農学研究科)

研究分担者 : 玄 学南 (帯広畜産大学 原虫病研究センター)

研究分担者 : 藤崎 幸蔵 (帯広畜産大学 原虫病研究センター)

研究分担者 : 長澤 秀行 (帯広畜産大学 原虫病研究センター)

(研究協力者:杉本 千尋)

(研究協力者:鈴木 宏志)

(研究協力者:Peter Mbatii)

(研究協力者:五十嵐 郁男)

(研究協力者:小沼 操)

(研究協力者:坂内 天)

(研究協力者:久保木 基高)

(研究協力者:Oriental Thekisoe)

(研究協力者:櫻井 達也)

(研究協力者:John Donelson)

(研究協力者:Dennis Grab)

(研究協力者:森 大輝)

(研究協力者:宮崎 綾子)

(研究協力者:細井 美佳)

(研究協力者:横山 奈津子)

(研究協力者:Waren Baticados)

(研究協力者:William Vitola)

(研究協力者:Kubi Kaluba)

(研究協力者:Ngin Nuon Pisey)

(研究協力者:Israni Ravi)

(研究協力者:Demetria Catalino)

(研究協力者:Sanjay Kumar)

(研究協力者:Teon Bun)

(研究協力者:John Omolo)

(研究協力者:Darunee Tuntasuvan)

(研究協力者:井上 美鈴)

## 交付決定額(配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	3,700	0	3,700
平成14年度	2,700	0	2,700
平成15年度	2,700	0	2,700
総計	9,100	0	9,100

## 研究発表

### 1) 学会誌等

1. Bannai, H., Sakurai, T., Inoue, N., Sugimoto, C. and Igarashi, I. (2003) Cloning and expression of a mitochondrial heat shock protein 70 of *Trypanosoma congolense* and potential use as a diagnostic antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10 (5): 926-933.
2. Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., Di Cello, F., Grab, D. J., Suzuki, H., Sugimoto, C. and Igarashi, I. (2003) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and its application for the detection of African trypanosomes. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (12): 5517-5524.
3. Inoue, N. and Peter A. Mbatia. (2003) Training course in molecular parasitology. *UNIQWA Bulletin of Parasitology*, 5 (2): 6-15.

### 2) 口頭発表

#### 国内学会

1. 井上昇、William H. Witola、細井美佳、長澤秀行、鈴木直義。 *Trypanosoma congolense* 種特異的抗原のクローニング。第34回日本原生動物学会大会(神戸)、2001年11月16日~18日。
2. 坂内天、井上昇、杉本千尋、長澤秀行。 *Trypanosoma congolense* ミトコンドリア HSP70 遺伝子のクローニング。第71回日本寄生虫学会大会(伊勢原)、2002年3月29日~30日。
3. 久保木基高、井上昇、櫻井達也、鈴木宏志、杉本千尋、五十嵐郁男。 Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP)法を用いたアフリカトリパノソーマ検出法の確立。第135回日本獣医学会学術集会(東京)、2003年3月30日~4月1日。
4. 櫻井達也、井上昇、石田秀史、宮崎綾子、Ngin Nuon Pisey、Demetria Catalino、Israni Ravi、小沼操、長澤秀行、杉本千尋、五十嵐郁男。組換えリボソームPO蛋白質を用いたトリパノソーマ特異的ELISA法の開発。第50回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部会(札幌)、2003年9月27日。
5. 櫻井達也、井上昇、石田秀史、宮崎綾子、Ngin Nuon Pisey、Demetria Catalino、Israni Ravi、小沼操、長澤秀行、杉本千尋、五十嵐郁男。組換えリボソームPO蛋

白質を用いたトリパノソーマ特異的ELISA法の開発。第136回日本獣医学会  
学術集会(青森)、2003年10月3日~5日。

#### 国際学会

1. Inoue, N. and Ikuo Igarashi. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and its application for the detection of African trypanosomes. The 24<sup>th</sup> Annual Meeting of the O.I.E. ad hoc Group on Non Tsetse Transmitted Animal Trypanosomes (NTTAT) (Paris). 18 May. 2003.
2. Inoue, N. Recent advances In the diagnosis of salivarian trypanosomes. Park31st Annual Conference of the Protozoological Society of Southern Africa (Golden Gate, South Africa). 7-11 Oct. 2002.

## 研究成果の概要

### LAMP 法によるトリパノソーマ特異的遺伝子検出法の開発。

LAMP 法は等温反応で高感度遺伝子増幅を行う方法である。また、遺伝子増幅の有無が反応液の濁度によって判別可能である。従って実施には単純なインキュベーター以外の特別な設備を要しない。LAMP 法のこのような特徴は、十分な施設・設備が利用できない開発途上国や小規模診療施設などで高感度病原体検出を実施する上で非常に有用である。トリパノソーマ慢性感染マウスを用いた実験では、直接検出 < PCR < LAMP の順に検出感度が高くなり、LAMP 法の有用性が検証された。従来から指摘されていた通り本実験においても、LAMP 法に用いる *Bst* DNA ポリメラーゼは PCR 法に使用する *Taq* DNA ポリメラーゼよりも血液由来酵素阻害因子の影響を受けにくいことを示唆する結果が得られた。タイ国・農務省・農産物食品局 (National Bureau of Agricultural Commodity and Food Standards (ACFS), Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok, Thailand) のツントスヴァン (D. Tuntasuvan) 博士との共同研究で、トリパノソーマ感染ブタからのトリパノソーマ検出を、直接検出法 (スメア法、遠心法)、マウス接種法、PCR 法、LAMP 法の各方法を用いて行った。その結果、LAMP 法は PCR 法と同等以上の高感度でトリパノソーマ遺伝子を検出した。反応所要時間および検出の簡便性では LAMP 法が PCR 法よりも優れている。今回の研究で、LAMP 法の野外使用における有用性は十分証明されたと考えるが、今後 LAMP 法に供する DNA サンプルの調製法については十分検討すべきである。LAMP 法は高感度であるため、今回の研究においても DNA 調製段階での試料間の相互汚染が問題となることがあった。

### 血清診断用抗原の探索

トリパノソーマミトコンドリア HSP70 およびリボソーム P0 蛋白質がアフリカトリパノソーマ検出 ELISA 抗原として有用であることが明らかとなった。リボソーム P0 蛋白質は C 末端に強い抗原性を示す領域を有することも明らかとなった。P0-C 末端領域の合成ペプチドを用いた ELISA でもトリパノソーマ感染血清を良好に検出可能であった。合成ペプチドを使用することによって組換え蛋白質の発現と精製など大幅に診断系構築のステップを削減することが可能となる。

*Trypanosoma congolense* 種特異抗原のクローニング

ならびに特異診断への応用

平成13年12月

(2001)

帯広畜産大学

原虫病研究センター

細井 美佳

## 目次

緒論	1
材料および方法	
1. トリパノソーマ原虫	3
2. 供試動物	3
3. プロサイクリック型虫体 (procyclic form, PCF) の培養	3
4. トリパノソーマ原虫の精製	4
5. PCF 抗原の作製	4
6. モノクローナル抗体 (mAb)	4
7. DNA シーケンス解析	5
8. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動	5
9. ウェスタンブロット法	5
10. PCR 法	6
11. プライマー	6
12. 組換えタンパクの発現と抗血清の作製	7
13. 間接蛍光抗体法	7
14. サザンブロット法	8
15. RNA 抽出法	8
16. ノーザンブロット法	9

結果

1. *Trypanosoma congolense* 種特異的遺伝子のクローニング 10
2. p74 の *T. congolense* 種特異性と mAb 20H12 に対する反応性 10
3. 抗 p74 マウス血清の作製と虫体に対する反応性 11
4. サザンブロット法及びノーザンブロット法による P74 の解析 11
5. P74 特異的 PCR の虫体検出感度 12

考察

13

結語

16

謝辞

18

文献

19

図表

22

英文抄録

34



## <緒論>

*Trypanosoma congolense* は Broden により 1904 年、コンゴにおいて羊から初めて検出された<sup>2)</sup>。同原虫は Salivarian トリパノソーマに属し、発育終末型（メタサイクリック型）が媒介昆虫の長吻部ないし唾液腺で形成され、昆虫の吸血時に唾液と共に宿主に注入されて感染が成立し、牛を始め、馬、羊、山羊、ラクダ、豚、さらに犬にも感染性があり、家畜トリパノソーマ病の病原体としてもっとも重要である<sup>7)</sup>。同原虫は、*Glossina palpalis*、*G. morsitans*、*G. austeni*、*G. pallidipes*、*G. longipalpis*、*G. tachinoides*、*G. vanhoofi* 及び *G. brevipalpis* などのツエツエバエにより媒介される。

トリパノソーマ病の最も確実な診断法はトリパノソーマを鏡検によって検出<sup>1) 5)</sup>することであるが、その他に実験動物接種検査（*T. vivax* の場合、ラットへの感染は可能性がきわめて低い）あるいは血清学的検査が行われている<sup>7)</sup>。しかしこれらの方法では病原体の種の同定は難しい。トリパノソーマ病は病原体の種によって治療薬が異なることがあるので、病原体の同定がきわめて重要になる。従来用いられてきた同定法は形態学的検索で、主として血液塗抹ギムザ染色標本を用いて行っていたが信頼性にかけるものがあった。現在はモノクローナル抗体法、アイソザイム法、核 DNA 交雑法、DNA 分子核型分析法などが検討されている<sup>7)</sup>が、疫学の面からも迅速に利用できる、高い感受性ならびに特異性を持ったトリパノソーマ病の検出法が求められている。

ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）は高感度かつ特異的に病原体を検出することが可能である<sup>6) 12)</sup>。トリパノソーマ病の診断においても PCR による高感度かつ特異的な検出法が報告されている<sup>4)</sup>。現在までに *Trypanozoom*

(*Trypanosoma brucei* spp., *T. evansi* および *T. equiperdum*)、*T. vivax*、*T. simiae*、  
および *T. congolense* (savannah, forest, および Kenya Coast) の特異的 PCR による  
検査法が確立している<sup>3) 12) 14)</sup>。

本研究では *T. congolense* 特異的診断法の開発を目標とし、新規にクローニン  
グした *T. congolense* 特異的遺伝子 (P74) について cDNA の全塩基配列の決定、  
虫体ゲノムでのコピー数と mRNA のサイズ、p74 タンパク質の虫体細胞内での  
局在部位、P74 遺伝子特異的 PCR の種特異性について検討したので報告する。

## <材料及び方法>

### 1. トリパノソーマ原虫

*Trypanosoma congolense* IL3000 株、IL1180 株、IL3338 株、*T. evansi* IL1695 株、IL1934 株、IL3354 株、IL3382 株、IL3960 株、IL3962 株、Tansui 株、*T. brucei brucei* GUTat3.1 株、*T. b. rhodesiense* IL1501 株、IL2343 株、*T. b. gambiense* IL1922 株、IL3248 株、IL3250 株、IL3254 株、IL3301 株、IL3707 株、Welcome 株は国際家畜研究所 (ILRI, Kenya) より分与され、当センターにて継代維持された後、10% ジメチルスルフォキシド含有感染マウス血液として凍結保存したものをを用い、実験に際しては C.B-17/Icr-scid/scid (SCID) マウス、BALB/c/A-+/+ (BALB/c) マウス及び C57BL/6J Jc1 (C57BL/6J) マウスに接種して増殖させた。

### 2. 供試動物

SCID マウス、BALB/c マウス及び C57BL/6J マウスは 8 週齢の雌を日本クレア株式会社 (日本) より購入し、当センター内動物飼育室で飼養した。

### 3. プロサイクリック型虫体 (Procyclic form, PCF) の培養

PCF の培養には TVM-1 培地 (10mM L-プロリン、2mM L-グルタミン、20% 牛胎仔血清 (FBS) 含有イーグル MEM (pH 7.2) 培地 (ニッスイ、日本)) を使用した。トリパノソーマ感染マウス血液と培養液を 1 : 9 の割合で混じ、低速遠心分離 (400×g、10 min、4°C) によって上清に

浮遊する血流型虫体 (Bloodstream form、BSF) を得た。In vitro で BSF を PCF に分化させるために TVM-1 培地で BSF 濃度を  $2 \times 10^6$  cell/ml に調製し、5 ml を T-25 フラスコに移して 27°C で 5 日間インキュベートした。得られた PCF は適時継代を行って維持した。

#### 4. トリパノソーマ原虫の精製

##### 4-1. BSF の精製

DE52 (Whatman International Ltd., UK) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによるトリパノソーマ BSF 精製法<sup>10)</sup>により感染血液中から BSF を分離し、Dulbecco's phosphate-buffered saline (pH 7.4) (PBS) で 3 回遠心洗浄 ( $1,500 \times g$ , 10 min, 4°C) した。

##### 4-2. PCF の精製

PCF 培養上清を  $1,500 \times g$ , 10 min, 4°C で遠心し、虫体を回収した。更に PBS で洗浄し、遠心 ( $1,500 \times g$ , 10 min, 4°C) する操作を 3 回繰り返した後、実験に使用した。

#### 5. PCF 抗原の作製

PCF 虫体を PBS に 0.1 g/ml で懸濁し、超音波破碎機を用いてホモジナイズし、PBS 中に分散させた。得られた PCF 抗原溶液の総蛋白量は BCA プロテインアッセイキット (PIERCE, USA) にて定量した。

#### 6. モノクローナル抗体 (mAb)

*Trypanosoma congolense* 種特異的 mAb 20H12 は原虫病研究センター

で作製され、維持されていたハイブリドーマ培養上清から硫酸塩析法により濃縮して使用した<sup>7)</sup>。

## 7. DNA シークエンス解析

DNA シークエンス解析は、ABI PRISM™ Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PERKIN ELMER、USA)及び ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PERKIN ELMER、USA)を用いて行った。

## 8. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

トリパノソーマ抗原を SDS-PAGE 用サンプル処理液 (0.5 M Tris HCl (pH 6.8)、20% グリセリン、10% 2-mercaptoethanol、4% SDS、0.05 % (w/v) bromophenol blue) と混合し熱処理 (95℃、4 min) した。各レーンの蛋白量が同一になるように SDS-PAGE 用処理液で希釈し、10% ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE で分離された各々の抗原の分子量は分子量マーカー (SDS-PAGE molecular weight standard high、BIO-RAD、USA) に対する相対移動度から算定した。

## 9. ウェスタンブロット法

トリパノソーマ抗原の SDS-PAGE は上述のごとく還元条件下、10% ゲルを用いて行い、常法に従って PVDF 膜 (Millipore、USA) に転写した。5% スキムミルク-PBS によるブロッキング後、一次抗体と反応させ、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体

(Blotting Grade Affinity Purified Goat Anti-Mouse IgG(H+M) Horseradish peroxidase Conjugate, BIO RAD, USA) を 1,000 倍に希釈したものをを用いた。検出用試薬には DAB (和光純薬工業株式会社、日本) を使用し、常法に従って呈色反応を行った。

## 10. PCR 法

PCR は final volume を 50  $\mu$ l、DNA テンプレートを 1  $\mu$ l にした。PCR 条件は、initial step 94  $^{\circ}$ C 10 min、40 cycle の amplification : 94 $^{\circ}$ C 30 sec, 55  $^{\circ}$ C 30 sec, 72  $^{\circ}$ C 30 sec、final extension step の 72  $^{\circ}$ C 7 min で行った。PCR 産物は 1.5% のアガロースゲルで泳動、ethidium bromide で染色、ultraviolet light 下にて写真撮影することによって可視化した。

## 11. プライマー

11-1. PCR プライマーセット 11 (5' GGC AAA CAT TCT CGT TCG 3') と 39 (5' AGC ACT ACG AGC AAAA CAT AC 3')

P74 種特異性検査用 PCR ならびに P74 特異的 PCR の虫体検出感度用に使用した。

11-2. PCR プライマーセット H42 Exp1(5' ATA TAG GAT CCC CAA GTG TTT TGG GAC CT 3') と H42 2000AS(5' ATA TAG GAT CCA CAA CAG ATA ATA TGG CAA 3')

P74 のクローニングに使用した。

11-3. PCR プライマーセット H42 2-21S (5' ATA TAG GAT CCG GAA TTC GGC ACG AGC AAG T 3') と H42 950AS (5' ATA TAG GAT CCT GAT

CTC CCT AAG GTA TTG C 3')

サザンブロット法およびノーザンブロット法におけるプローブ作製に使用した。

## 12. 組換えタンパクの発現と抗血清の作製

組換えタンパク質は大腸菌発現ベクター pGEM EX-2 (Promega, USA) を用いて発現し、説明書にしたがって粗精製した。抗血清は 8 週齢の BALB/c マウスに Freund's complete adjuvant (Difco, Detroit, MI) と共に組換え蛋白を免疫し、2 週間おきに Freund's incomplete adjuvant (Difco) と共に 7 回追加免疫して作製した。

## 13. 間接蛍光抗体法

前述のトリパノソーマ原虫の精製法にしたがって調製した虫体浮遊液をスライドガラス上に数滴滴下し、ドライヤーで風乾した。風乾後、冷メタノール中に 10 min 浸漬固定した。固定後、PBS で洗浄し 50、100、200、400、800、1600、3200 倍希釈した抗血清及びコントロールとして抗 Gene 10 フュージョン蛋白血清をスライド標本上に滴下し、37°C で 30 min 湿潤箱中に静置した。次に標本を PBS で 3 回、各 5 min 洗浄し、FITC 標識ヤギ抗マウス IgG (Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-Mouse IgG(H&L)-FITC, TAGO Inc., USA) を滴下して、37°C で 30 min 湿潤箱中に静置した。その後標本を PBS 中で上記と同様に洗浄し、ヨウ化プロピジウムによる DNA 染色後、50% Glycerol 含有 PBS で封入して、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS NT, Leica, Germany) 又は蛍光顕微鏡 (ECLIPSE E600, Nikon, 日本)

を用いて観察した。

#### 14. サザンブロット法

虫体ゲノムでのコピー数を知るためにトリパノソーマゲノム DNA を制限酵素 (*Bam* H I、*Hind* III、*Xba* I、*Dra* I、*Eco* R I、*Pvu* II) で処理した後、1% TAE ゲルで泳動を行った。常法に従って、DNA をメンブレン(Hybond-N;Amersham-Buchler、 Braunschweig、 Germany)に転写し、ピオチン標識したプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは 42 °C、 overnight で行ないメンブレンを洗浄したのち、増感紙をセットしたカセットに X 線フィルムとメンブレンを入れ感光させて検出した。

#### 15. RNA 抽出法

サンプルに TRIZOL (TRIZOL Reagent、 GIBCO BRL) を加え、ポルトロンホモジナイザーにて 1 min ホモジナイズし、室温にて 5 min 放置した。TRIZOL の 1/5 量の chloroform を加え、よく攪拌し室温にて 2 min 放置し、15,000 rpm、15 min、4 °C で遠心を行った。上層に等量の isopropanol (IPA) を加え、室温にて 10 min 放置し、15,000 rpm、10 min、4 °C で遠心を行った。沈澱を 0.5 ml の TRIZOL に溶解し、TRIZOL の 1/5 量の chloroform を加えるところから繰り返した。2 度目の沈澱を 70% エタノールで洗浄し、沈澱を軽く乾燥させ、沈澱に DEPC Water を 20  $\mu$ l 加えてピペッティングによって溶解し、65 °C で 10 min 放置したのち、吸光度測定した (A260 nm)。



## 16. ノーザンブロット法

虫体ゲノムでの mRNA のサイズを知るために、トリパノソーマ RNA (各レーン 10  $\mu$ g) を常法に従ってホルマリン-アガロースゲルを用いて泳動した。泳動終了後は、サザンブロット法と同様にメンブレンに転写、固定化してサザンブロット法と同様にハイブリダイゼーションおよび検出を行なった

## <結果>

### 1. *Trypanosoma congolense* 種特異的遺伝子のクローニング

*Trypanosoma congolense* 種特異的 mAb 20H12 を用いて *T. congolense* PCF 由来 cDNA ライブラリーをイムノスクリーニングした結果 1 種類の陽性クローン (H42) が得られた<sup>8)</sup>。H42 の全塩基配列を決定したところ、部分長の cDNA クローンであったので、得られたシーケンス結果をもとに H42 クローンの既知 5' 末端配列と *T. congolense* mRNA の 5' 末端側のスプライスリーダー (SL) 配列 (ACG AGG TTT CTG TAC TAT ATT G) からプライマーを設定し、H42 クローンの未知 5' 末端配列を PCR によってクローニングし、全塩基配列を決定した (Fig. 1)。得られた cDNA は 1,935 bp のオープンリーディングフレームを含んでおり、644 アミノ酸から成る分子量約 74 kDa のタンパク質をコードしていることが明かとなったので、同 cDNA クローンを P74 と命名した。P74 の塩基配列またはアミノ酸配列に対して高い相同性を示す既知遺伝子またはタンパク質は存在しなかったが、p74 タンパク質は分子内に ABC ファミリータンパク質<sup>1) 5) 11)</sup> に保存されるドメインを有することが明かとなった (Fig. 2)。

### 2. P74 の *T. congolense* 種特異性と mAb 20H12 に対する反応性

p74 を大腸菌で発現し、ウェスタンブロット法にて mAb 20H12 に認識されるか否かを検討した。その結果、組換え p74 抗原は mAb 20H12 と反応しなかった (データ未掲載)。そこで p74 が *T. congolense* 種に特異的に存在するか否かを再検討する目的で *T. congolense* を含む 3 種の IL3000、IL1180 ならびに IL3338 株のトリパノソーマから抽出したトータル DNA を鋳型にプライマ

— 11 (5' GGC AAA CAT TCT CGT TCG 3') および 39 (5' AGC ACT ACG AGC AAAA CAT AC 3') を使用して PCR を行った。その結果、p74 は *T. congolense* 種に特異的に存在することが再認識された (Figs. 3, 4)。

### 3. 抗 p74 マウス血清の作製と虫体に対する反応性

p74 タンパク質が *T. congolense* 種特異的抗原か否かを検討する目的で抗組換え p74 マウス血清を作製し、ウェスタンブロット法および間接蛍光抗体法 (IFAT) を行った。まずはじめに *T. congolense* IL3000 プロサイクリック型虫体のホモジネートを用いてウェスタンブロット法を行った。その結果、分子量約 84 kDa に特異的バンドが検出された (Fig. 5)。次にウェスタンブロット法で用いたのと同じ抗血清を用いて IFAT を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察し、p74 の細胞内局在部位を検索した。その結果、*T. congolense* IL3000 PCF では鞭毛の先端が強く反応していた (Fig. 6)。一方、*T. congolense* IL3000 BSF では細胞質内が不均一に反応していた (Fig. 6)。また、これらの反応パターンは *T. congolense* の異なる株間で同一であったが、異種のトリパノソーマには抗 p74 血清は反応しなかった (結果未掲載)。

### 4. サザンブロット法及びノーザンブロット法による P74 の解析

*T. congolense* IL3000 の DNA ならびに RNA の抽出を行い、サザンブロット及びノーザンブロットを行った。サザンブロット法では抽出した DNA を使用したプローブ内を切断しない制限酵素 *Bam* H I、*Hind* III および *Xba* I、一ヶ所切断する制限酵素 *Dra* I、*Eco* R I および *Pvu* II にて切断し、泳動後ハイブリダイゼーションを行った。その結果、*Bam* H I、*Hind* III および *Xba* I

ではそれぞれバンドが1つ得られ、順に 9,600 bp、8,200 bp および 12,700 bp であった (Fig. 8)。一方、*Dra* I と *Pvu* II ではバンドが2つ得られ、それぞれ 5,200 bp と 3,000 bp、5,800 bp と 2,800 bp であった (Fig.7)。また、*Eco* R I ではバンドが3つ得られ 8,800 bp、5,000 bp と 2,100 bp であった (Fig.7)。ノーザンブロット法ではバンドが2つ得られ、2,700 b と 2,000 b であった (Fig.7)。

#### 5. P74 特異的 PCR の虫体検出感度

P74 特異的プライマーである 11 と 39 を使用して、虫体検出感度を感染マウス血液および培養虫体から抽出した DNA を鋳型に比較検討した。コントロールとして *T. congolense* 特異的多コピー反復配列を標的とするプライマーセット、TCN1 (5' TCG AGC GAG AAC GGG CAC TTT GCG A 3') および TCN2 (5' ATT AGG GAC AAA CAA ATC CCG CAC A 3') を使用した。培養虫体及び感染血液を虫体濃度 (cells/ml)  $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10、1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  になるよう調製し、コントロールとして培養虫体では PBS を感染血液では同種の非感染マウス血液を使用した。その結果、TCN1/TCN2 セットでは両方ともに  $10^{-2}$  虫体濃度まで検出できる高感度を示したが、11/39 セットでは培養虫体では  $10^{-1}$  虫体濃度まで検出が見られたのみで感染血液では検出ができなかった (Figs. 8, 9)。

## <考察>

本研究の最終目的は、*T. congolense* 特異的診断法の開発である。そこでまずはじめに *T. congolense* 種特異的 mAb 20H12 を用いて同原虫 PCF 由来 cDNA ライブラリーをイムノスクリーニングし、最終的に完全長の cDNA クローン (P74) を得た。P74 の全塩基配列およびアミノ酸配列のホモロジー検索では類似する遺伝子は見つからなかったが、この P74 が ABC 1 ファミリータンパク質に保存されている ABC 1 ドメインを有することが明らかとなった。ABC 1 ファミリーに属するタンパク質は大腸菌や酵母から最初に報告されたタンパク質で、真核生物ではミトコンドリアに局在し電子伝達系で電子担体として必要不可欠な補酵素 Q を生合成するために必要である<sup>1) 5) 11)</sup>。本研究では P74 が ABC 1 ドメインを持つことによってどのような機能を果しているのかは、解明することができなかったが、ABC 1 ドメインを持つことは今後 P74 の機能解析に役立つことになると思う。

イムノスクリーニングに用いた mAb 20H12 が認識する虫体抗原は分子量約 119 kDa および 122 kDa の 2 種類であるが<sup>8)</sup>、p74 タンパク質の予想分子量が 74 kDa であることから、組換え p74 タンパク質を作製し、ウェスタンブロット法で 20H12 との反応性を確認した。ところが、P74 は 20H12 によるイムノスクリーニングでクローニングされた遺伝子であるにもかかわらず、同 mAb を用いたウェスタンブロット法では反応しなかった (結果未掲載)。以上の結果から、P74 は 20H12 に対する擬陽性クローンであったことが疑われたため、再度 P74 遺伝子の *T. congolense* 種特異性を PCR、ウェスタンブロット法および IFAT にて解析した。まず初めに、組換え p74 に対する抗血清をマウスで作製し、IFAT

を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、*T. congolense* IL3000 PCF では鞭毛の先端が強く反応し、細胞質が弱く反応していた。一方、*T. congolense* IL3000 BSF では細胞質内が不均一に反応していた。同様な反応性は *T. congolense* 他の株においても認められたが、異種のトリパノソーマ (*T. evansi* および *T. brucei*) では反応しなかったことから p74 は新既の *T. congolense* 種特異的抗原であることが明らかとなった。p74 と 20H12 認識抗原の局在が鞭毛先端に共通し、両抗原とも種特異抗原であることは両タンパク質の機能的関連性などを示唆しており大変興味深い。ウェスタンブロット法による解析の結果、抗 p74 血清は分子量約 84 kDa の PCF 抗原を認識することが明かとなり、このことは p74 と 20H12 によって認識される種特異抗原が別のタンパク質であることを示している。

次に P74 の虫体ゲノムでのコピー数と mRNA のサイズを知るためにサザンブロット法とノーザンブロット法を行った。ノーザンブロット法では 2.7 kb および 2.0 kb の 2 本のバンドが得られた。これは、似た配列をもった mRNA が存在するか、あるいは P74 の mRNA が転写後にスプライシングをうけてサイズの小さい 2.0 kb の mRNA を生じた可能性を示している。サザンブロット法では P74 が虫体ハプロイドゲノム中に 1 コピー存在する結果が得られた。*Eco* R I で切断した場合に得られた 3 本のバンドはハプロイドゲノム配列間の多型性によるものかもしれない。

最後に p74 を使用した特異診断への検討について述べる。従来行われていた感染血液を顕微鏡で調べる方法やツェツェバエの解剖ではその鑑定の正確さや迅速さに問題があった。しかし PCR および ELISA などの方法を使用することによってそれらの問題を克服することができる<sup>6) 9) 13)</sup>。従って、P74 特異的

プライマー (11, 39) を用いた PCR 法での特異診断を検討した。その結果、培養虫体から抽出した虫体 DNA を鋳型に用いた場合、P74 プライマーと TCN プライマーとの検出感度はそれぞれ  $10^1$  虫体および  $10^2$  虫体でほぼ同レベルであった。ところが、感染血液からの検出感度は P74 プライマーで  $10^4$  虫体濃度でも検出できないという結果であった。この結果は、P74 のコピー数が 1 コピーしかないことによると考えられるが、宿主動物の血液内の PCR 阻害物質などが関係しているかもしれない。血液サンプルからの虫体 DNA の PCR 増幅に関して同様の結果が *T. congolense* の forest 型および Kenya Coast 型での検出においても報告されている<sup>4)</sup>。今回の実験で使用した *T. congolense* IL3000 は Kenya Coast 型であり、感染血液から検出できなかった原因は過去の報告と同様と推測されるが詳細は不明である。細胞内局在が虫体ステージによって異なるこのような蛋白を標的とした *T. congolense* 特異診断はこれが初めてであり、特異診断のみでなくそのタンパク質としての機能を解明していく面においても研究を進めて行く意義はある。

## <結語>

*Trypanosoma congolense* は、ツェツェバエ (*Glossina* spp.) によって生物学的に媒介され、家畜にアフリカトリパノソーマ症を引き起こし、アフリカの畜産業に大きな被害を与えている。トリパノソーマ病の最も確実な診断法はトリパノソーマを鏡検によって検出することである。しかしこのような方法では病原体の種の同定は難しく、診断や疫学調査の観点から迅速で感受性ならびに特異性が高いトリパノソーマ病の検出法が求められている。

本研究では、新規にクローニングした *T. congolense* 特異的遺伝子 (P74) の全塩基配列を決定した。P74 の全塩基配列およびアミノ酸配列のホモロジー検索では類似する遺伝子は見つからなかったが、この p74 が ABC 1 ファミリータンパク質に保存されている ABC 1 ドメインを有することが明らかとなった。次に、組換え p74 に対する抗血清をマウスで作製し、IFAT を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、*T. congolense* IL3000 PCF では鞭毛の先端が強く反応し、細胞質が弱く反応していた。*T. congolense* IL3000 BSF では細胞質内が不均一に反応していた。同様な反応性は *T. congolense* 他の株においても認められたが、異種のトリパノソーマ (*T. evansi* および *T. brucei*) では反応しなかった。

次に P74 の遺伝子情報を収集するためにサザンブロット法とノーザンブロット法を行った。ノーザンブロット法では 2.7 kb および 2.0 kb の 2 本のバンドが得られた。サザンブロット法では P74 が虫体ハプロイドゲノム中に 1 コピー存在する結果が得られた。



最後に P74 特異的プライマー (11, 39) を用いた PCR 法での特異診断を検討した。その結果、培養虫体から抽出した虫体 DNA を鋳型に用いた場合、P74 プライマーの検出感度は  $10^1$  虫体レベルで高感度であった。ところが、感染血液からの検出感度は P74 プライマーで  $10^4$  虫体濃度でも検出できないという結果であった。しかし、細胞内局在が虫体ステージによって異なるこのような蛋白を標的とした *T. congolense* 特異診断はこれが初めてであり、特異診断のみでなくそのタンパク質としての機能を解明していく面においても研究を進めて行く意義はある。

## <謝辞>

稿の結びに臨み、終始、ご懇篤なご指導と校閲を賜った帯広畜産大学 長澤秀行教授ならびに井上昇講師に心から拝謝し、本研究の実施にあたり、適切な御指導と御協力を頂いた、前センター長（現日本大学 生物資源科学部獣医公衆衛生学講座）見上彪教授ならびに Willam H. Witola 外国人研修生に深甚なる謝意を表します。本論文作成に当たり、適切な御助言を頂いた、帯広畜産大学 藤崎幸蔵教授、五十嵐郁男教授、杉本千尋教授、鈴木宏志教授、玄学南助教授、横山直明講師に深く感謝の意を表します。また、終始励ましと御指導を頂いた帯広畜産大学・松尾智英研究員、金晶勲研究員、西川義文研究員、Levi Makara 研究員、そして貴重な御援助を頂いた帯広畜産大学原虫病分子免疫研究センターの教室員各員に心から感謝します。最後に、研究室での3年間終始励ましと御支援を頂いた同期の池田浩康君、金澤亜希さん、塚本大輔君、永井章子さん、宮崎綾子さんならびに原虫病研究センターの皆さまに深く感謝いたします。

<参考文献>

1. Bousquet I., Dujardin G. and Slonimski P. P. (1991). ABC 1, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bcl complex. EMBO J. 10, 2023-2031.
2. Broden A. (1904) Les infection à trypanosomes dans l'`etat du Congo. Bull. Soc. Etudes Colon. 11, 116-142.
3. Clausen P. H., Wiemann A., Patzelt R., Kakaire D., Poetzsch C., Peregrine A., Mehrlitz D., 1998. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. In naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. Ann. N. Y. Acad. Sci. 29, 21-31.
4. Deswuesnes M., McLaughlin G., Zoungrana A., D`avila A. M. R., 2001. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. Parasitol. 31, 610-614.
5. Do T. Q., Hsu A. Y., Jonassen T., Lee P. T., and Clarke C. F. (2001). A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae abc 1* mutants. J. Biol. Chem. 276, 18161-18168.
6. Hide, G. & Tait, A. (1991). The molecular epidemiology of parasites. *Experientia*. 47, 128-42.
7. 蛭海 啓行 (1986) 動物の住血微生物病、牛：トリパノソーマ病. 南 哲郎、藤永 徹 (編) . 獣医住血微生物病、第一版 pp. 170-193. 近代出版、東京.

8. Inoue N., Lluz A. T., Mori T., Nagasawa H., Fuzisaki K., and Mikami T. (2000). Novel species specific antigens of *Trypanosoma congolense* and their different localization among life-cycle stages. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 1041-1045.
9. Kwok S. & Sninsky J. J. (1989). Application of PCR to the detection of human infectious diseases. In *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, (ed. Erlich, H. A.). New York. Pp.235-244.
10. Lanham S. M. and Godfrey D. G. (1970) Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 28, 521-534.
11. Macinga D. R., Cook G. M., Poole R. K., and Rather P. N. (1998). Identification and characterization of *aarF*, a locus required for production of ubiquinone in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli* and for expression of 2'-N-acetyltransferase in *P. stuartii*. *J. Bacteriol.* 180, 128-135.
12. Majiwa P. A. O., Maina M., Waitumbi J. N., Mlhok S. and Zewygarth E. (1992). *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology.* 106, 151-162.
13. Masiga D. K., Smyth A. J., Hayes P., Bromidge T. J., Gibson W. C., 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.* 22, 909-918.
14. Moser D. R., Cook G. A., Ochs D. E., Bailey C. P., McKane M. R. and Donelson J. E., 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology.* 99, 57-66.
15. Murray M., Murray P. K. & McIntyre W. I. M. (1977). An improved parasitological

technique for diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*

71, 325-326.

Table 1 抗*T. congolense* 単クローン抗体

クローン	アイソタイプ	抗原の分子量 (kDa)	抗原の局在	種特異性
1C6	IgG1	65	細胞質全体	交叉反応
4D4	IgG2a	37	リボソームPO 蛋白質	交叉反応
4H1	IgG1	41, 44, 54, 61, 66	細胞質全体	交叉反応
10F9	IgG1	76	mitHSP70	交叉反応
16C6	IgG1	多数のバンド	細胞質全体	交叉反応
20H12	IgG3	119, 122	BSF: べん毛 PCF: べん毛先端 EMF: 細胞質の一部 MCF: べん毛	種特異的
53DC8	IgG2a	62, 64, 66	べん毛	交叉反応

BSF; 血流型、PCF; プロサイクリック型、EMF; エピマスティゴート型、  
MCF; メタサイクリック型

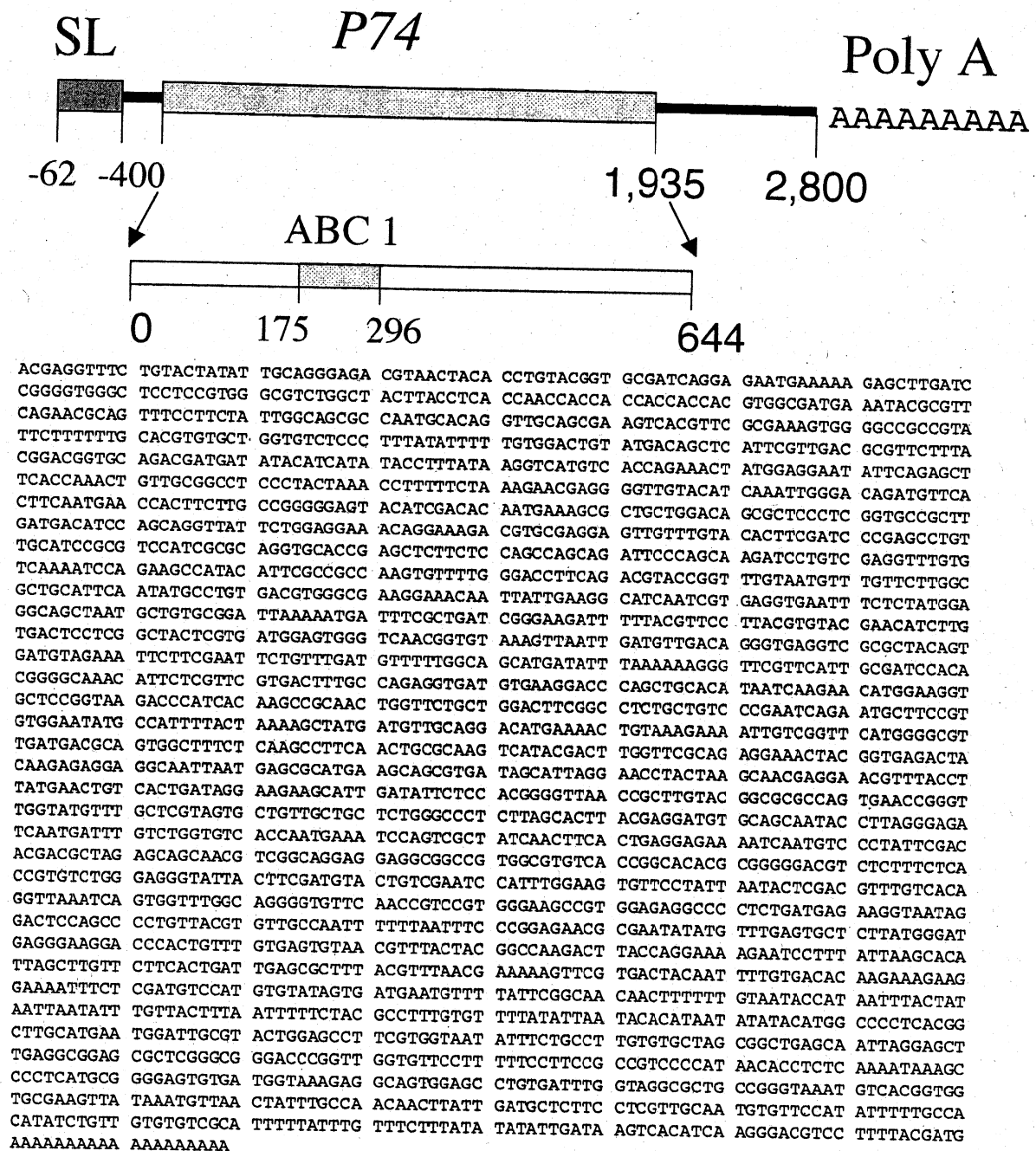


Fig. 1 全塩基配列が明らかとなったcDNAクローン

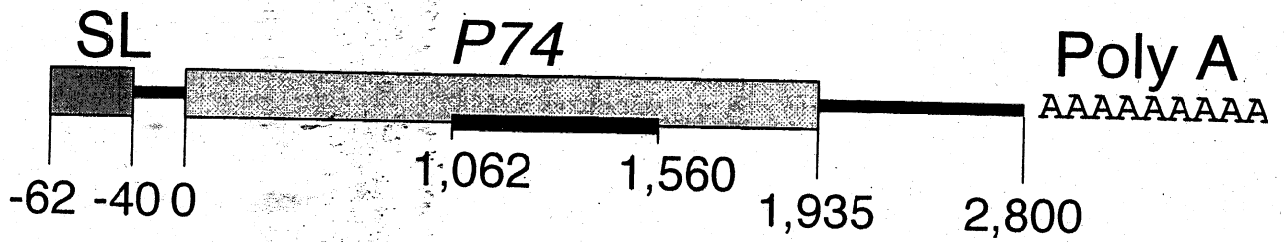
20H12を用いて*T. congolense* PCF由来cDNAライブラリーをイムノスクリーニングした結果、1種類の陽性クローン(H42)を得た。H42の全塩基配列を決定したところ、部分長のcDNAクローンであったので、得られたシーケンス結果をもとにH42クローンの既知5'末端配列と*T. congolense* mRNAの5'末端側のスプライサー(SL)配列(ACG AGG TTT CTG TAC TAT ATT G)からプライマーを設定し、H42クローンの未知5'末端配列をPCRによってクローニングし、全塩基配列を決定した。得られたcDNAは1,935 bpのオープンリーディングフレームを含んでおり、644アミノ酸から成る分子量約74 kDaのタンパク質をコードしていることが明らかとなったので、同cDNAクローンをP74と命名した。

ABC1CD	1	EELGAPV	EEIFAE	FDEEPIA	AASIAQV	HRAVL	KDGE	-----	EVA	VKVQR	44	
p74ABC1domain	1	EETGKTC	EELFVH	FDFEPVA	SASIAQV	HRAALL	QPADS	QQDP	VEVC	VKIQK	50	
ABC1CD	45	PGVKKR	IRADL	KLLKFL	AKILKL	FPPGG	RLLDLD	WLVD	EFKSL	LPQEL	DFL	94
p74ABC1domain	51	PYIARR	QVFWDL	QTYRF	VMFV	LGAFN	---MPV	TWAKE	ETIEG	INRE	VNFS	97
ABC1CD	95	REARNAE	RFREN	FADDP	WVVPK	VY	119					
p74ABC1domain	98	MEARNAV	RIKND	FADRED	FVVPY	VY	122					

### Fig. 2 ABC 1 と類似する配列を含むP74

P74 の全塩基配列およびアミノ酸配列のホモロジー検索では類似する遺伝子は見つからなかったが、P74 がABC 1 ファミリータンパク質に保存されているABC 1 ドメインを有することが明らかとなった。ABC 1 (Activity of bc1 complex) ファミリータンパク質とは、大腸菌や酵母から最初に報告されたタンパク質で、真核細胞ではミトコンドリアに局在し、電子伝達系で電子担体として必要不可欠な補酵素Qを合成するために必要である。





ACGAGGTTTC TGTACTATAT TGCAGGGAGA CGTAACTACA CCTGTACGGT GCGATCAGGA GAATGAAAAA GAGCTTGATC  
 CGGGGTGGGC TCCTCCGTGG GCGTCTGGCT ACTTACCTCA CCAACCACCA CCACCACCAC GTGGCGATGA AATACGCGTT  
 CAGAACGCAG TTTCTTCTTA TTGGCAGCCG CAATGCACAG GTTGCAGCGA AGTCACGTTT CCGAAAAGTGG GGCCGCCGTA  
 TTCTTTTTTTG CACGTGTGCT GGTGTCTCCC TTTATATTTT TGTGGACTGT ATGACAGCTC ATTCGTTGAC GCGTCTTTTA  
 CGGACGGTGC AGACGATGAT ATACATCATA TACCTTTATA AGGTCATGTC ACCAGAAACT ATGGAGGAAT ATTCAGAGCT  
 TCACCAAACT GTTGGGGCCT CCCTACTAAA CCTTTTTCTA AAGAACGAGG GGTGTACAT CAAATTGGGA CAGATGTTC  
 CTTCAATGAA CCACTTCTTG CCGGGGAGT ACATCGACAC AATGAAAGCG CTGTGGACA GCGTCCCTC GGTGCCCTT  
 GATGACATCC AGCAGGTTAT TCTGGAGGAA ACAGGAAAGA CGTGCCGAGG GTTGTGTGTA CACTTCGATC CCGAGCCTGT  
 TGCATCCGCG TCCATCGCGC AGGTGCACCG AGCTCTTCTC CAGCCAGCAG ATTCACGACA AGATCCTGTC GAGGTTTGTG  
 TCAAAATCCA GAAGCCATAC ATTCCGCCGC AAGTGTTTTG GGACCTTCAG ACGTACCGGT TTGTAATGTT TGTCTTGGC  
 GCTGCATCA ATATGCCTGT GACGTGGGCG AAGGAACAA TTATTGAAGG CATCAATCGT GAGGTGAAT TCTCTATGGA  
 GGCAGCTAAT GCTGTGCGGA TTAAAATGA TTTCGCTGAT CGGGAAGATT TTTACGTTCC TTACGTGTAC GAACATCTTG  
 TGACTCCTCG GCTACTCGTG ATGGAGTGGG TCAACCGTGT AAAGTTAATT GATGTTGACA GGGTGAGGT CCGCTACAGT  
 GATGTAGAAA TTCTTCGAAT TCTGTTGAT GTTTTTGGCA GCATGATATT TAAAAAGGG TTCGTTTCATT GCGATCCACA  
 CGGCAAAGGC ATTCTCGTTC GTGACTTTGC CAGAGGTGAT GTGAAGGACC CAGCTGCACA TAATCAAGAA CATGGAAGT  
 GCTCCGGTAA GACCCATCAC AAGCCGCAAC TGGTTCGCT GGACTTCGGC CTCTGCTGTC CCGAATCAGA ATGCTTCCGT  
GTGGAATATG CCATTTTACT AAAAGCTATG ATGTTGCAGG ACATGAAAAC TGTAAGAAA ATGTGCGGTT CATGGGGCGT  
TGATGACGCA GTGGCTTTCT CAAGCCTTCA ACTGCCAAG TCATACGACT TGGTTCGCAG AGGAAACTAC GGTGAGACTA  
CAAGAGAGGA GGCATTAAT GAGCGCATGA AGCAGCGTGA TAGCATTAGG AACCTACTAA GCAACGAGGA ACGTTTACCT  
TATGAACTGT CACTGATAGG AAGAAGCATT GATATTCTCC ACGGGGTAA CCGCTTGATC GCGCGCCAG TGAACCGGTT  
TGGTATGTTT GCTCGTAGTG CTGTTGCTGC TCTGGGCCCT CTTAGCACTT ACGAGGATGT GCAGCAATAC CTTAGGGAGA  
 TCAATGATTT GTCTGGTGTG ACCAATGAAA TCCAGTCCGT ATCAACTTCA CTGAGGAGAA AATCAATGTC CCTATTGCGA  
 ACGACGCTAG AGCAGCAACG TCGGCAGGAG GAGGCGGCCG TGGCGTGTCA CCGGCACACG CCGGGGACGT CTCCTTTCTA  
 CCGTGTCTGG GAGGGTATTA CTTCGATGTA CTGTGCAATC CATTTGGAAG TGTTCCATT AATACTCGAC GTTTGTGACA  
 GGTTAAATCA GTGGTTTGGC AGGGGTGTTT AACCGTCCGT GGGAGCCGT GGAGAGGCC CTCTGATGAG AAGGTAATAG  
 GACTCCAGCC CCFGTTACGT GTTGCCAAAT TTTTAAATTC CCGGAGAACG CGAATATATG TTTGAGTGCT CTTATGGGAT  
 GAGGGAAGGA CCCACTGTTT GTGAGTGTAA CGTTTACTAC GGCCAAGACT TACCAGGAAA AGAATCCTTT ATTAAGCACA  
 TTAGCTTGT CTTCACTGAT TGAGGCTTTT ACGTTTAAAC AAAAAAGTTC TGACTACAAT TTTGTGACAC AAGAAAGAAG  
 GAAAATTTCT CGATGTCCAT GTGTATAGT ATGAATGTTT TATTCGGCAA CAACTTTTTT GTAATACCAT AATTTACTAT  
 AATTAATATT TGTTACTTTA ATTTTCTTAC GCCTTTGTGT TTTATATTA TACACATAAT ATATACATGG CCCCTCACGG  
 CTTGCATGAA TGATTGCGT ACTGGAGCCT TCGTGGTAAT ATTTCTGCCT TGTGTGCTAG CCGCTGAGCA ATTAGGAGCT  
 TGAGGCGGAG CGTCCGGCG GGAACCGGTT GGTGTTCCCT TTCTCTCCG CCGTCCCAT AACACCTCTC AAAATAAAGC  
 CCCTCATCGG GGGAGTGTGA TGGTAAAGAG GCAGTGGAGC CTGTGATTTG GTAGGCGCTG CCGGTAATAT GTCACGGTGG  
 TCGGAAGTTA TAAATGTTAA CTATTTGCCA ACAACTTATT GATGCTCTTC CTCGTTGCAA TGTGTTCCAT ATTTTGTCCA  
 CATATCTGTT GTGTGTCGCA TTTTTATTG TTTCTTTATA TATATTGATA AGTCACATCA AGGACGCTCC TTTTACGATG  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

Fig. 3 PCR 増幅部位

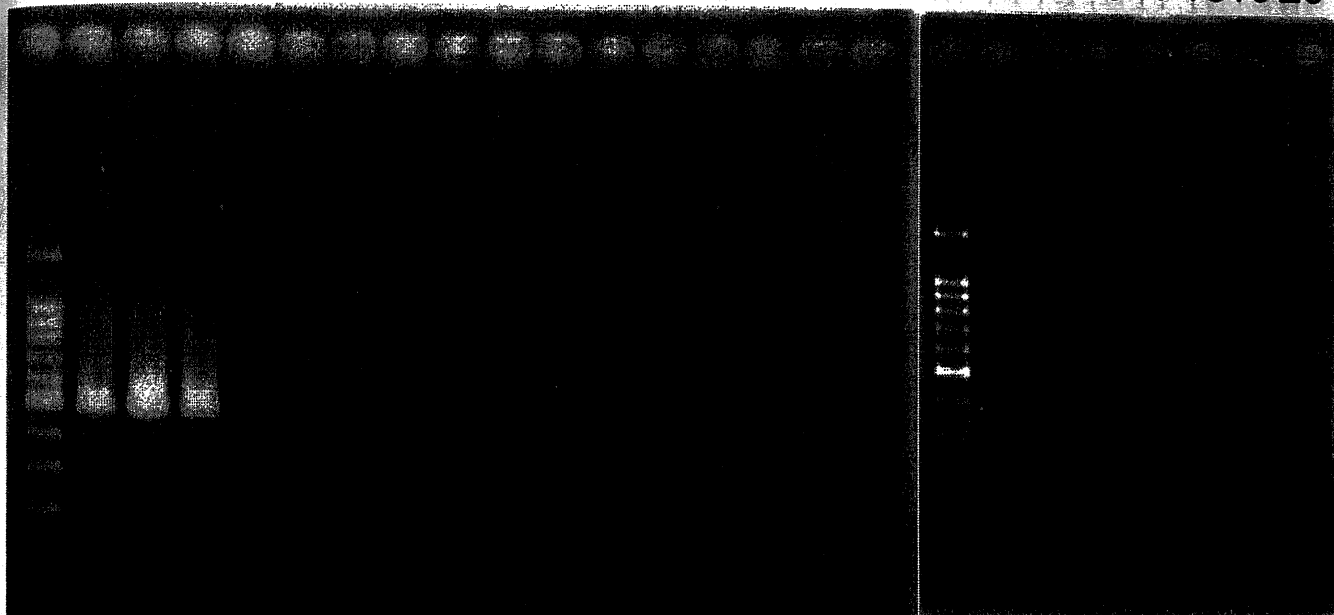
P74 の *T. congolense* 種特異性を検討するPCR ならびにP74 特異的PCR の虫体検出感度を検討するPCR で下線部の部分を増幅した。

*T. congolense* *T. evansi*

*T. brucei*

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

M 14 15 16 17 18 19 20



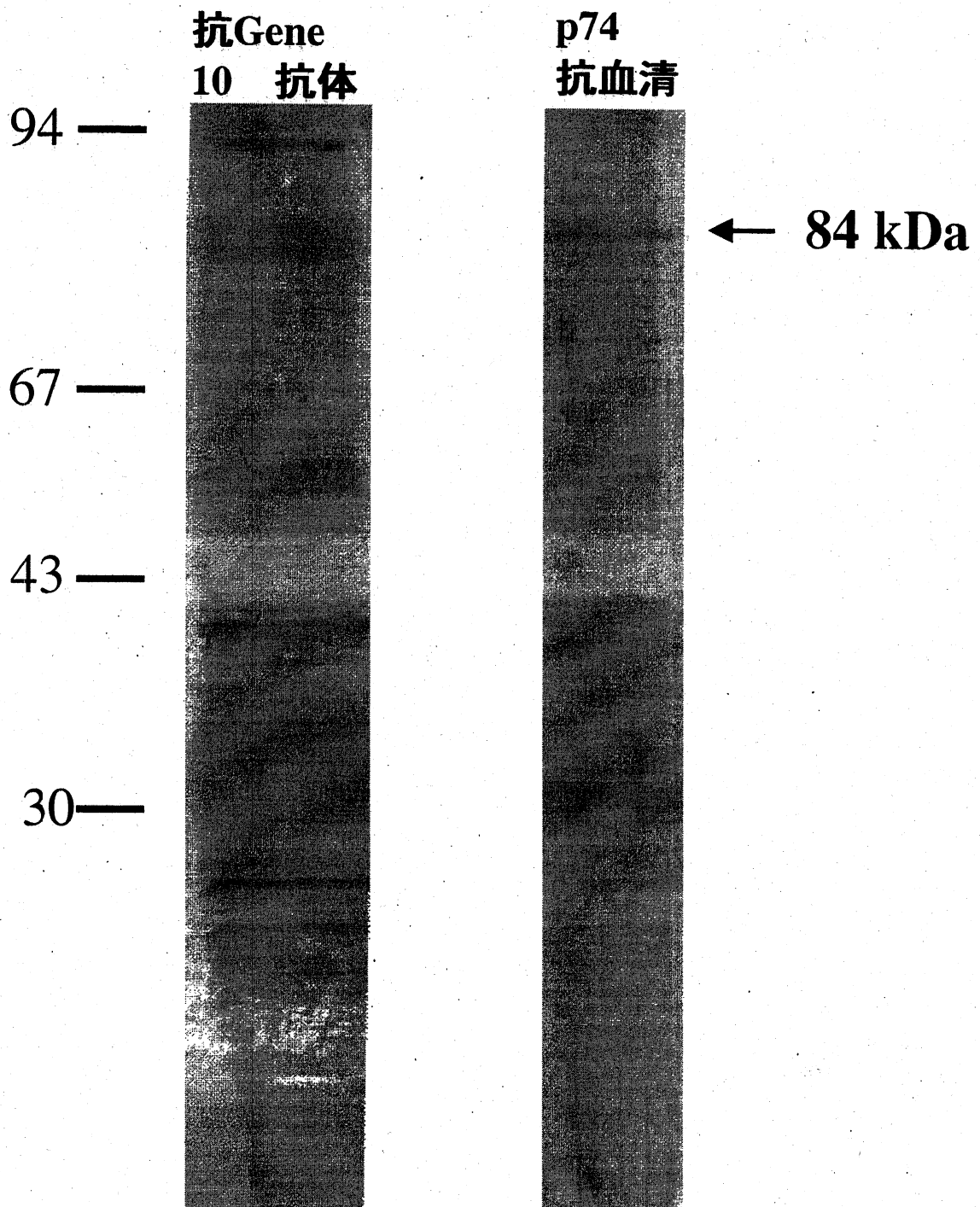
No.	Specis	Strain	Place	Year
1	<i>T. congolense</i>	IL1180	Tanzania	1971
2	<i>T. congolense</i>	IL3000	Kenya/Tanzania	1966
3	<i>T. congolense</i>	IL3338	ND	ND
4	<i>T. evansi</i>	IL1695	Kenya	1978
5	<i>T. evansi</i>	IL1934	South America	1971
6	<i>T. evansi</i>	IL3354	Mali	1988
7	<i>T. evansi</i>	IL3382	Mali	1988
8	<i>T. evansi</i>	IL3960	Kenya	1980
9	<i>T. evansi</i>	IL3962	Sudan	1976
10	<i>T. evansi</i>	Tansui	Taiwan	ND
11	<i>T. b. gambiense</i>	IL1922	Ivory Coast	1952
12	<i>T. b. gambiense</i>	IL3250	Nigeria	1969
13	<i>T. b. gambiense</i>	IL3248	Nigeria	1969
14	<i>T. b. gambiense</i>	IL3254	South Sudan	1982
15	<i>T. b. gambiense</i>	IL3707	Nigeria	1968
16	<i>T. b. rhodesiense</i>	IL2343	Ivory Coast	1978
17	<i>T. b. gambiense</i>	IL3301	Nigeria	1969
18	<i>T. b. rhodesiense</i>	IL1501	Kenya	1980
19	<i>T. b. gambiense</i>	Welcome	ND	ND
20	<i>T. b. brucei</i>	GUTat3.1	Uganda	1966

M: 100 bp ladder

Place: Place of isolation, Year: Year of isolation, ND: no data.

#### Fig. 4 PCR 法によるP74 遺伝子の種特異性解析

トリパノソーマから抽出したトータルDNAを鋳型にプライマー11 (5' GGC AAA CAT TCT CGT TCG 3') および39 (5' AGC ACT ACG AGC AAAA CAT AC 3') を使用してPCR を行い、PCR 産物は1.5% のアガロースゲルで泳動、ethidium bromide で染色、ultraviolet light 下にて写真撮影をした。レーン1~20には様々なトリパノソーマのDNA を使用したPCR 産物を、レーンMには100 bp マーカーを泳動した。



**Fig. 5 ウェスタンブロット法によるp74 抗血清の反応**  
*T. congolense* IL3000 プロサイクリック型虫体のホモジネートを用いてウェスタンブロット法を行い、抗Gene 10 抗体およびp74 抗血清を使用して検出した。左に分子量マーカを示した。

(A) FITC標識抗体染色

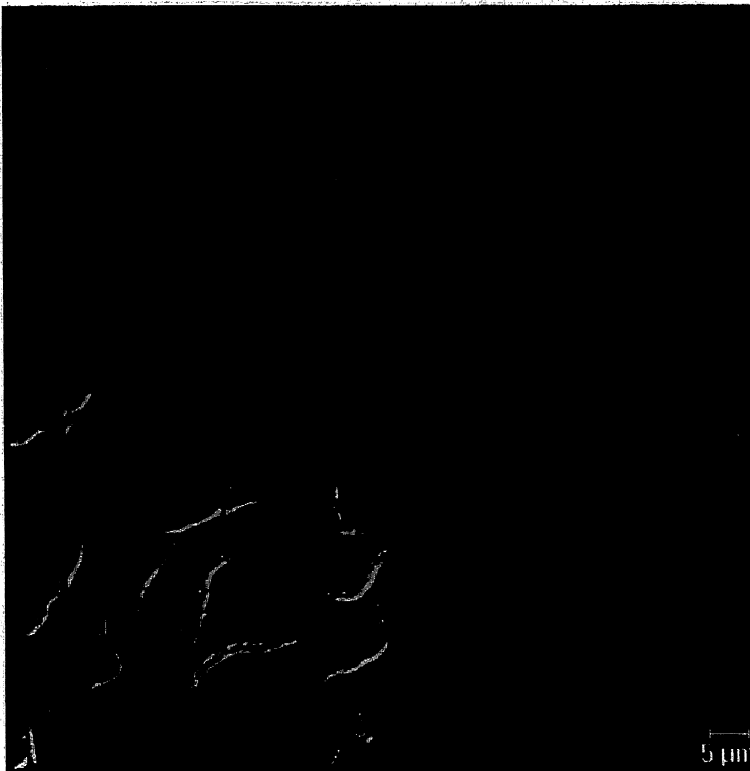
DNA染色



抗Gene10抗体

(B) 微分干渉像

重ね合わせ像

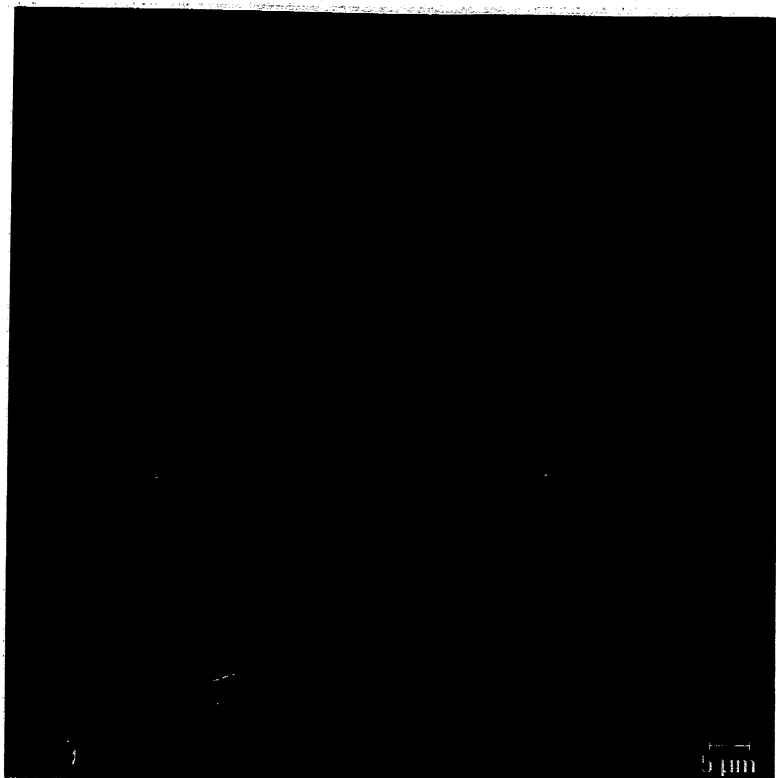


2次抗体のみ

**Fig. 6 (1) p74 の局在**

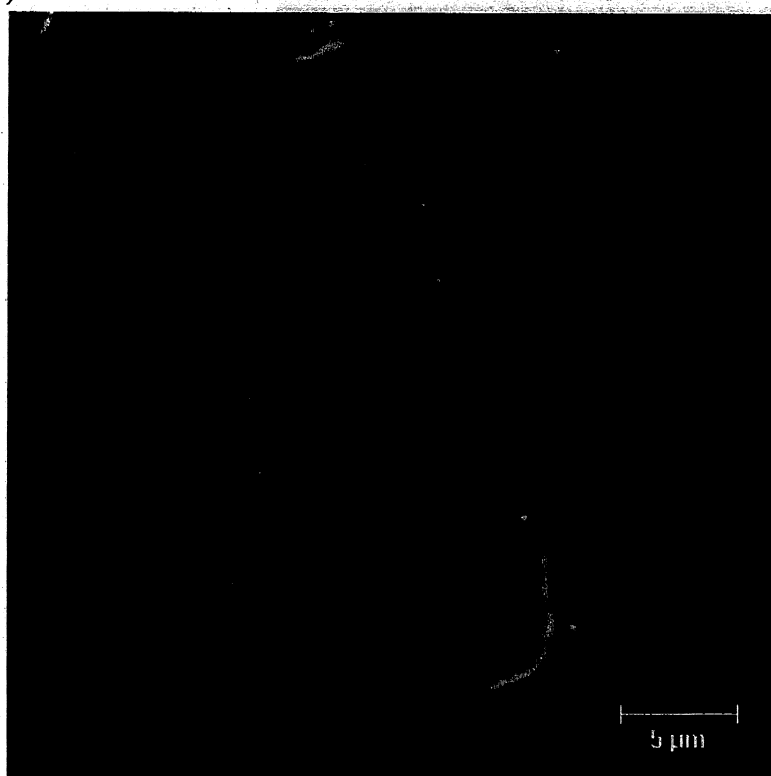
*T. congolense* IL 3000 と抗Gene 10 抗体(A) および2次抗体(B) のみを用いてIFAT を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。核とキネトプラストはpropidium iodide にて染色をした。

(A)



抗p74抗体

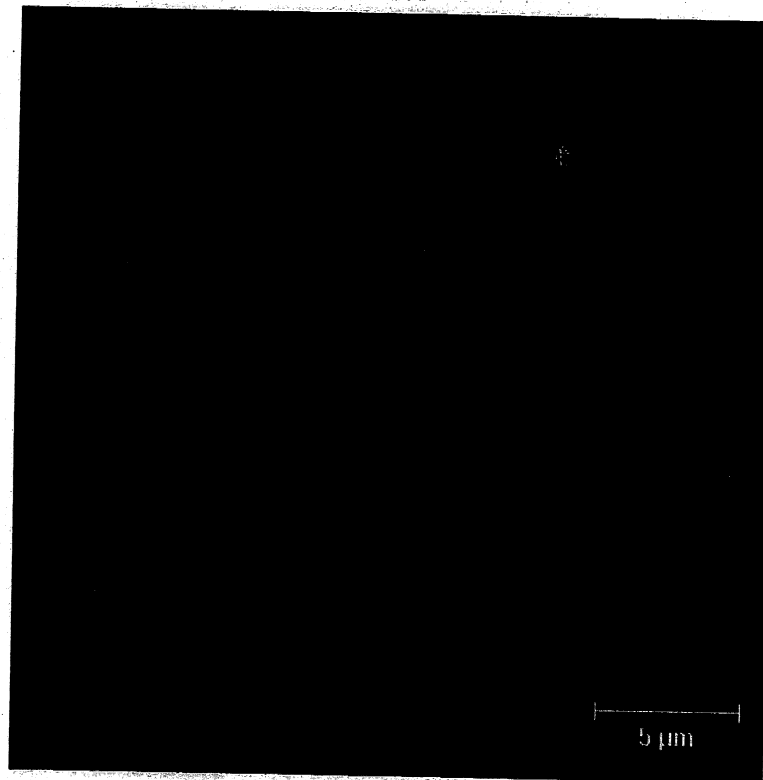
(B)



**Fig. 6 (2) p74 の局在**

*T. congolense* IL3000 PCFと抗p74 抗血清を用いてIFATを行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。核とキネトプラストはpropidium iodideにて染色した。(B); FITC標識抗体染色のクローズアップ像。

## 抗p74抗体



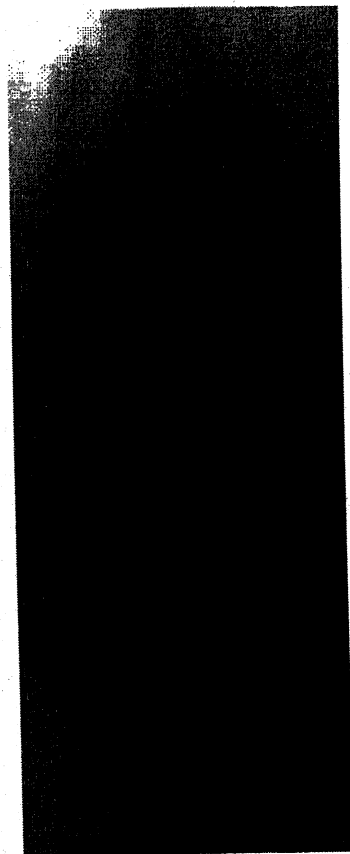
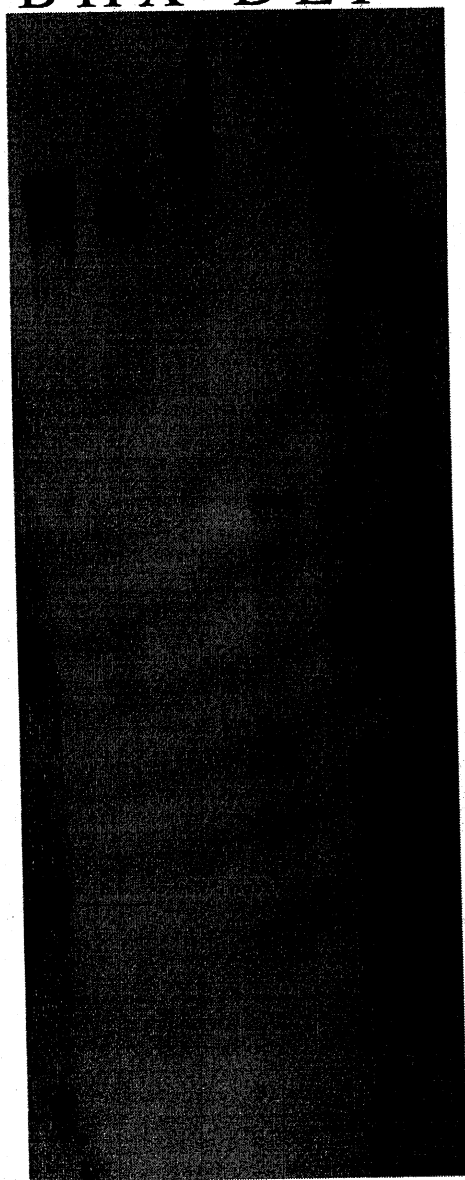
### Fig. 6 (3) p74の局在

*T. conglense* IL3000 BSF とp74 抗血清を用いてIFAT を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。核とキネトプラストはpropidium iodide にて染色した。重ね合わせ像のクローズアップ。

# Southern blotting Northern blotting

Non-cutters 1-cutters

B H X D E P



2.7 kb

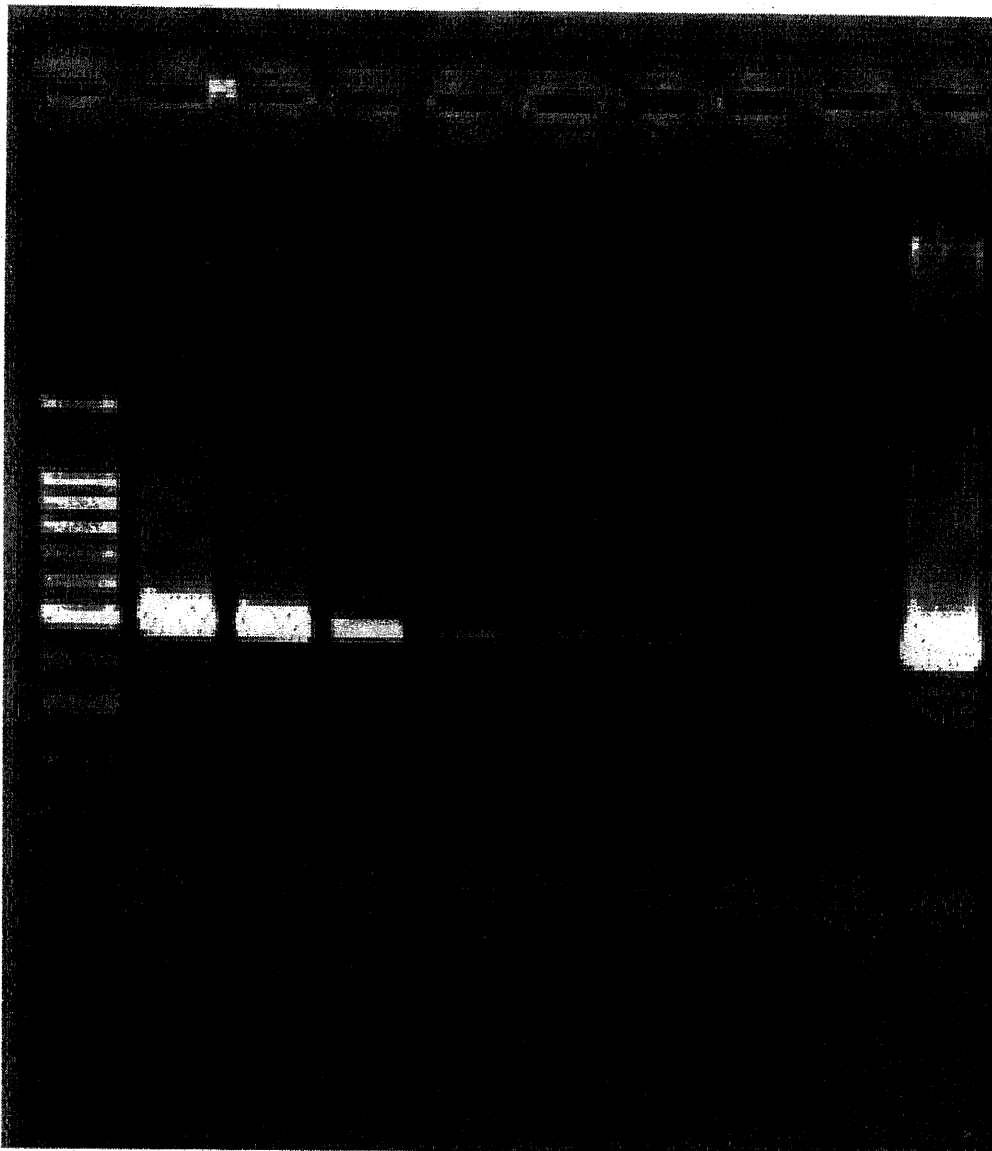
2.0 kb

B: *Bam* H I  
H: *Hind* III  
X: *Xba* I  
D: *Dra* I  
E: *Eco* R I  
P: *Pvu* II

**Fig. 7 ノーザンブロット法およびサザンブロット法**

サザンブロット法では抽出したDNA を使用したプローブ内を切断しない制限酵素 *Bam* H I、*Hind* III および *Xba* I、一ヶ所切断する制限酵素 *Dra* I、*Eco* R I および *Pvu* II にて切断し、泳動後ハイブリダイゼーションを行い、メンブレンを洗浄したのち、増感紙をセットしたカセットにX線フィルムとメンブレンを入れ感光させて検出した。ノーザンブロット法では抽出したトリパノソームRNA（各レーン10 $\mu$ g）をホルマリ ン-アガロースゲルを用いて泳動し、泳動終了後はサザンブロット法と同様にメンブレンに転写、固定化してサザンブロット法と同様にハイブリダイゼーションおよび検出を行なった。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



1: 虫体濃度  $10^4$     6:  $10^{-1}$   
2:  $10^3$             7:  $10^{-2}$   
3:  $10^2$             8: negative control  
4: 10                9: positive control  
5: 1                 M: 100 bp ladder

**Fig. 8 P74 遺伝子特異的PCR法の検出感度 (培養虫体)**

P74特異的プライマーである11と39を使用して、虫体検出感度を培養虫体から抽出したDNAを鋳型にPCRを行い、培養虫体は虫体濃度 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10、1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ になるよう調製をした。PCR産物は1.5%のアガロースゲルで泳動し、ethidium bromideで染色、ultraviolet light下にて写真撮影をした。レーンMには100 bp マーカーを泳動した。



1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16



No.	虫体濃度	プライマー	No.	虫体濃度	プライマー
1	$10^4$	11/39	9	$10^4$	TCN 1/2
2	$10^3$	11/39	10	$10^3$	TCN 1/2
3	$10^2$	11/39	11	$10^2$	TCN 1/2
4	10	11/39	12	10	TCN 1/2
5	1	11/39	13	1	TCN 1/2
6	$10^{-1}$	11/39	14	$10^{-1}$	TCN 1/2
7	$10^{-2}$	11/39	15	$10^{-2}$	TCN 1/2
8	negative control		16	negative control	

M: 100 bp ladder

**Fig. 9 P74 遺伝子特異的PCR法の検出感度（感染血液）**

P74 特異的プライマーである11 と39 を使用して、虫体検出感度を感染マウス血液から抽出したDNA を鋳型に検討した。コントロールとして *T. congolense* 特異的多コピー反復配列を標的とするプライマーセット、TCN 1およびTCN 2 を使用した。虫体濃度は $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10、1、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ になるよう調製をした。PCR 産物は1.5%のアガロースゲルで泳動し、ethidium bromide で染色、ultraviolet light 下にて写真撮影をした。レーンMには100 bp マーカーを泳動した。

## **Novel Species Specific Antigen of *Trypanosoma congolense***

**Mika Hosoi**

National Research Center for Protozoan Diseases

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

Obihiro, Hokkaido 080-8555, JAPAN

Noboru INOUE, D. V. M., Ph. D.

Supervisor

A 1,935 bp cDNA (*P74*) encoding *Trypanosoma congolense* species specific protein was isolated and sequenced. The predicted open reading frame was 644 amino acids (aa). *P74* showed no homology with any other gene reported. However, *P74* included the ABC-1 domain. The trypanosome haploid genome contained single copy of *P74*. Northern analysis revealed the presence of two transcripts (2.0 and 2.7 kb) of *P74*. Localization of the antigen recognized by the anti-p74-serum was determined in bloodstream form (BSF) and procyclic form (PCF) by confocal laser scanning microscopy. The antigen localization corresponded with tip of a flagellum and part of cytoplasm in PCF, and part of cytoplasm in BSF. Then, we developed a sensitive and specific method to identify *T. congolense* using *P74* specific PCR. As a result, sensitivity of the PCR was not enough to detect the parasite from infected blood. Although, further studies will be required for a full characterization of the *T. congolense*

specific p74 antigen, the p74 may be useful in not only establishment of *T. congolense* specific diagnosis methods but also studies on molecular mechanisms regulating differentiation of the parasite during life-cycle.