

異種遺伝子発現用原虫ベクターの開発と応用

研究室 遺伝生化学研究分野
Research Unit for Genetic Biochemistry

事業推進担当者 玄 学南 (Xuenan Xuan)

研究室ホームページ <http://www.obihiro.ac.jp/~geneticbiochem/>

研究要旨

動物性タンパク質資源の生産性向上を図る上で、産業動物の感染症の制圧は不可欠である。動物の感染症を制圧する有効な手段の一つとしてベクターワクチンが挙げられる。これまでに数多くのウイルスや細菌などが弱毒生ワクチン用ベクターとして開発されているが、いまだ有効な原虫ベクターは開発されていないのが現状である。そこで、本研究では異種遺伝子発現用原虫ベクターの開発と応用を試みた。まず、弱毒生ワクチンが商品化され、*in vitro* 培養が容易なトキソプラズマ原虫を候補原虫としてベクター化を行った。次に、トキソプラズマ原虫に近縁なネオスポラ原虫とクリプトスポリジウム原虫由来のワクチン候補遺伝子をそれぞれトキソプラズマ原虫ベクターに導入したところ、天然型抗原に類似した組換えタンパク質の発現が可能であることが示唆された。さらに、トキソプラズマ原虫ベクターはサイトカインなど生理活性物質の発現にも有効であることが示された。

原虫のベクター化

原虫ベクター化の第一歩として、薬剤耐性遺伝子と自然発光遺伝子を選択マーカーとした迅速で簡便な組換えトキソプラズマ原虫作製法を確立した。トキソプラズマ原虫由来のピリメタミン耐性ジヒドロ葉酸レダクターゼチミジル酸シンターゼ (DHFR-TS) 遺伝子と海洋生物由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子発現ユニットの間にマルチクローニングサイト (MCS) を持つトランスファーベクター-pDMG を構築した。MCS に外来抗原遺伝子を挿入した pDMG プラスミドを *Electroporation* 法によりトキソプラズマ原虫に導入した後に、ピリメタミンによる薬剤選択と GFP によるカラー選択を行ったところ、目的の外来抗原遺伝子を発現する組換えトキソプラズマ原虫を効率よく作製することに成功した。一方、トキソプラズマ原虫に類似したネオスポラ原虫のベクター化にも成功した。

原虫ベクターによる異種抗原の発現と評価

1) ネオスポラ原虫のワクチン抗原 NcSRS2を発現する組換えトキソプラズマ原虫の作製とワクチン効果の評価：ネオスポラ原虫（主に牛の流産を引き起こす原虫）

の主要ワクチン候補抗原 NcSRS2遺伝子を発現する組換えトキソプラズマ原虫 Tg/NcSRS2を作製した。組換え Tg/NcSRS2により発現された NcSRS2の局在、分子量及び抗原性などはネオスポラ原虫由来の天然型 NcSRS2に類似していることが示された。次に、Tg/NcSRS2全虫体タンパク質をマウスに2週間間隔で2回免疫し、最終免疫後2週目に病原性ネオスポラ原虫にて攻撃したところ、Tg/NcSRS2免疫組では陰性対照群の Tg/GFP 免疫組より有意な感染防御効果が認められた。

2) クリプトスポリジウム原虫のワクチン抗原 CpP23を発現する組換えトキソプラズマ原虫の作製とワクチン効果の評価：クリプトスポリジウム原虫（主に子牛の下痢症を引き起こす原虫）の主要ワクチン候補抗原 CpP23遺伝子を発現する組換えトキソプラズマ原虫 Tg/CpP23を作製した。組換え Tg/CpP23により発現された CpP23の局在、分子量及び抗原性などはクリプトスポリジウム原虫由来の天然型 CpP23に類似していることが示された。Tg/CpP23の全虫体タンパク質をマウスに2週間間隔で2回免疫したところ、血中に高力価の抗 CpP23抗体の上昇が認められた。さらに、この抗 CpP23抗体はクリプトスポリジウム原虫の増殖を有意に抑制することも示唆された。

3) トキソプラズマ原虫のワクチン抗原 TgSAG1を発現する組換えネオスポラ原虫の作製とワクチン効果の評価：トキソプラズマ原虫の主要ワクチン候補抗原 TgSAG1を発現する組換えネオスポラ原虫 Nc/TgSAG1を作製した。組換え Nc/TgSAG1により発現された TgSAG1の局在、分子量及び抗原性などはトキソプラズマ原虫由来の天然型 TgSAG1に類似していることが示された。次に、Nc/TgSAG1虫体のマウスにおける免疫原性を検討した。Nc/TgSAG1虫体をマウスに4週間間隔で2回接種した後に特異抗体反応を ELISA 法にて測定したところ、高い抗 TgSAG1抗体の誘導が認められた。また、抗血清の IgG サブクラスの同定を行ったところ、IgG2aの方がIgG1より高い値を示したことから、細胞内寄生原虫の感染防御反応に重要とされる Th1反応が優勢であることが推察された。さらに、Nc/TgSAG1虫体を接種したマウスに致死量のトキソプラズマ原虫にて攻撃したところ、有意な感染防御効果が得られた。

原虫ベクターによる異種生理活性物質の発現と評価

以上に示した結果より、組換えトキソプラズマ原虫は異種抗原遺伝子の発現に有効であることが示唆されたが、サイトカインなど免疫賦活剤の発現にも有効であるか否

かを検討した。細胞内寄生性原虫感染症の感染防御に最も重要な役割を果たすとされるインターフェロン γ 遺伝子を発現する組換えトキソプラズマ原虫 Tg/mIFN- γ を作製した。組換え Tg/mIFN- γ により発現された mIFN- γ は、マウス由来の天然型 IFN- γ に類似した生物活性を有することが示唆された。

発表論文

著者名	論文タイトル	掲載雑誌	巻	ページ	発行年
Khan, A., Bohme, U., Kelly, K. A., Adlem, E., Brooks, K., Simmonds, M., Mungall, K., Quail, M. A., Arrowsmith, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Harris, D., Collins, M., Fosker, N., Fraser, A., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Murphy, L., O'Neil, S., Rajandream, A., Saunders, D., Seeger, K., Whitehead, S., Mayr, T., Xuan, X., Watanabe, J., Suzuki, Y., Wakaguri, H., Sugano, S., Sugimoto, C., Paulsen, I., Mackey, A. J., Roos, D. S., Hall, N., Berriman, M., Barrell, B., Sibley, L. D., Ajioka, J. W.	Common inheritance of chromosome Ia associated with clonal expansion of <i>Toxoplasma gondii</i> .	Genome Res.	16	1119-1125	2006
Shirafuji, H., Xuan, X., Kimata, I., Takashima, Y., Shinya, F., Otsuka, H., Nagasawa, H., Suzuki, H.	Expression of P23 of <i>Cryptosporidium parvum</i> in <i>Toxoplasma gondii</i> and evaluation of its protective effects.	J. Parasitol.	91	476-479	2005
Takashima, Y., Xuan, X., Kimata, I., Iseki, M., Kodama, Y., Nagane, N., Nagasawa, H., Matsumoto, Y., Mikami, T., Otsuka, H.	Recombinant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) expressing P23 protein of <i>Cryptosporidium parvum</i> induces neutralizing antibodies in rabbits.	J. Parasitol.	89	276-282	2003
Nishikawa, Y., Xuan, X., Makala, L., Vielemeyer, O., Joiner, K.A., and Nagasawa, H.	Characterization of <i>Toxoplasma gondii</i> engineered to express mouse interferon-gamma.	Int. J. Parasitol.	33	1525-1535	2003
Mishima, M., Xuan, X., Yokoyama, N., Igarashi, I., Fujisaki, K., Nagasawa, H., Mikami, T.	Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing <i>Toxoplasma gondii</i> ROP2 antigen inducible protective immunity in cats.	Parasitol. Res.	88	144-149	2002

異種遺伝子を発現する組換えトキソプラズマ原虫

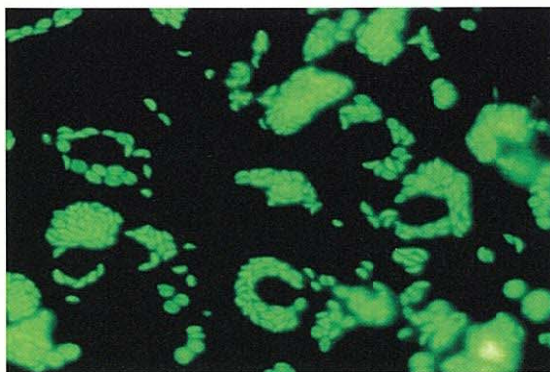


図1：組換えトキソプラズマ原虫は、GFP 遺伝子を発現するために、蛍光顕微鏡下で容易にクローニングできる。

異種抗原を発現する組換え原虫ベクターワクチンの感染防御効果

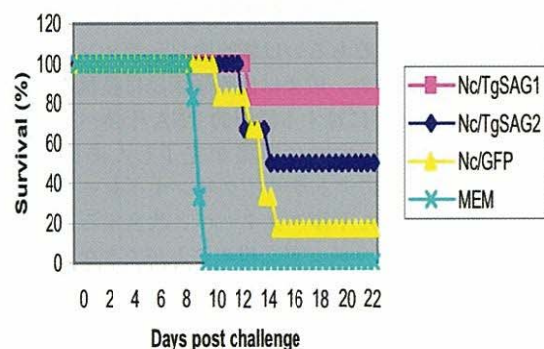


図2：トキソプラズマ原虫のワクチン抗原 TgSAG1 を発現する組換えネオスポラ原虫 (Nc/TgSAG1) を免疫したマウスは致死量のトキソプラズマ原虫の攻撃から生き残ることができる。