

多包虫組換え Em-95 抗原の血清学的反応性

Serological Reactivity of Recombinant Em-95 Antigen for Alveolar Echinococcosis

孝口 裕一 松本 淳* 鈴木 智宏
加藤 芳伸 八木 欣平

Hirokazu KOGUCHI, Jun MATSUMOTO, Tomohiro SUZUKI,
Yoshinobu KATOH and Kinpei YAGI

Key words : *Echinococcus multilocularis* (多包条虫) ; alveolar echinococcosis (多包虫症) ; Em-95 antigen (Em-95 抗原) ; serodiagnosis (血清診断)

現在、多包虫症 (Alveolar Echinococcosis) の血清診断は、感染者の血清中に含まれる抗体と幼虫から抽出した粗抽出抗原との反応を ELISA 法及びウェスタンブロット法により検出する手法により行われている¹⁾。ここで使用される粗抽出抗原は、簡便に低コストで調製できる優れた抗原である反面、その品質に関していくつかの問題を抱えている。特に、ロット間の抗原成分の変動は特定のタンパク質バンドの検出によって結果を判定するウェスタンブロット法において著しく影響を及ぼす場合がある。

これまでの研究で、多包虫症診断に特に有効とされている EmII/3 抗原を 5 つに分割した各領域、アクチンフィラメント断片化タンパク質 (AFFP) の N 末端領域 (#8s) 及び Antigen B の全長などを組換えタンパク質抗原として発現・精製し、それぞれ、多包虫症患者血清との反応性を報告した²⁻⁴⁾。しかしながらこれらの組換え抗原に対しても著しく反応性の乏しい患者血清が存在することが確認されており⁵⁾、さらなる血清診断用抗原の改良が求められている。

Em-95 抗原は、Lightowers ら⁶⁾ によって初めて単離された、活性化されたオンコスフェラに特徴的に発現すると推察されているタンパク質である。このタンパク質は中間宿主感染防御効果を示すことが知られており、単包虫 Eg-95 抗原を用いた単包虫症の予防に関して多くの報告がある⁷⁻⁹⁾。しかしながら、Em-95 を用いた多包虫症における研究の進展は限定的であり、特に血清学的反応性に関する報告は皆無である。

今回、当所で維持・継代している多包虫根室株の Em-95 抗原の組換えタンパク質発現系及びその精製法を確立し、さらに本組換え抗原と多包虫症患者血清との反応性に

関して興味深い知見が得られたので報告する。

方 法

1. 材 料

DNA の抽出に用いた多包虫シストは DBA マウスにおいて実験的に継代した根室株を用いた。Em-95 以外の組換え抗原は先に報告された方法に従って調製した^{2,3)}。多包虫症患者血清 12 件のうち、No.1~4 は認定患者血清であり、No.8~12 は当所の確定診断にて陽性と判定された血清試料である。

2. 組換え抗原の発現と精製

Em-95 抗原をコードする遺伝子は 2 つの intron を含む 3 つの exon から構築されている (Fig. 1)。このうち、主要な領域がコードされている exon 2 をフォワードプライマー (5'GGT ACC AAT TGA GAT AAA GAC AAC AGA GAG 3') 及びリバースプライマー (5'AGA TCT AAT GCG AAG TGT TTT TAT GTC 3') を用いて PCR 法により増幅した。それぞれのプライマーには制限酵素サイト (*Kpn*I 及び *Bgl*II) を付加した。PCR に用いた鋳型 DNA は多包虫シストから DNeasy Tissue kit

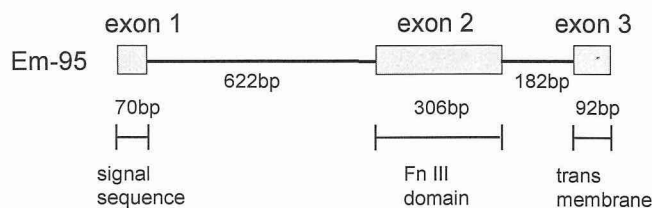


Fig. 1 Diagrammatic Representation of the Gene Structure of Em-95 from *Echinococcus multilocularis* (cited from Gauci et al.⁶⁾)

*北海道大学大学院獣医学研究科

(Qiagen 社製) を用いて抽出した。増幅 DNA 断片を pThioHis ベクターに組み込み、大腸菌 Top 10 株に導入した。形質転換させた Top 10 は、0.5 mM IPTG 存在下で 32°C、4 時間タンパク質の発現を誘導した。発現させた抗原タンパク質は、ProBond (インビトロジェン社製) レジンをういたアフィニティークロマトグラフィー及び Hiload Superdex75pg (アマシャムバイオサイエンス社製) カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (AKTA explore) により精製した。

3. イムノプロットング

組換え抗原の多包虫症患者血清に対する反応性は、イムノプロット法によって調べた。最初にそれぞれの組換え抗原タンパク質を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。分離されたタンパク質をゲルから PVDF 膜 (バイオラッド社製) に転写し、5% スキムミルクを含む PBS-Tween 中で 1 時間室温でブロッッキングした後、400 倍に希釈した患者血清と室温で 1 時間反応させた。さらに PVDF 膜を PBS-Tween で 10 分間洗浄し、この操作を 3 回繰り返した。5% スキムミルクを含む PBS-Tween 中で 2,500 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Sigma 社製) を 1 時間室温で反応させた。反応終了後、PBS-Tween で 15 分間、3 回の洗浄を行ってから、基質の BCIP/NBT (第一化学薬品(株)製) を加え、約 5 分間発色させた。

結果及び考察

1. 組換え Em-95 抗原の発現と精製

組換え抗原の発現は SDS-PAGE 及びウェスタンブロットにより評価した。Fig. 2 に示すように、組換え Em-95 抗原は分子量約 27 kDa を示すタンパク質として同定された。アフィニティークロマトグラフィーによって粗精製された画分には分子量約 34 kDa を示す夾雑物の存在が確認された。このため、Superdex75pg カラムを用いてさらに

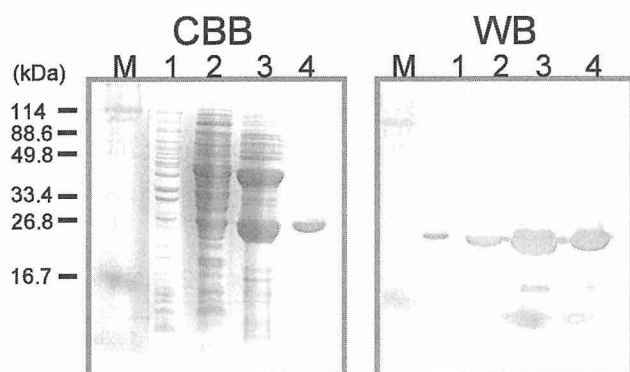


Fig. 2 SDS-PAGE and Western Blot Analysis Showing Recombinant Em-95 Antigen

Lanes M, molecular marker; 1, insoluble fraction; 2, soluble fraction; 3, affinity purified fraction; 4, FPLC fraction. Recombinant Em-95 antigen was probed with anti-ThioHis antibody on the Western blot analysis.

精製を進めた。その結果、2つのタンパク質ピークとして分離溶出され、後者のピークにほぼ均一な組換え Em-95 抗原が含まれていることを SDS-PAGE による純度検定により確認した (Fig. 2 及び 3)。今回用いた発現系において、培地 1 L の培養スケールから、約 5 mg の組換え抗原が精製標品として得られた。

Em-95 抗原をコードする遺伝子は、2つの intron を含む 3つの exon 領域、exon 1 (70 bp)、exon 2 (306 bp) 及び exon 3 (92 bp) から構築されている。このうち exon 1 の領域は、翻訳後修飾により切断されるシグナルペプチドがコードされており、成熟後にはタンパク質には存在しないと考えられる。今回組換えタンパク質として発現した領域は、成熟 Em-95 分子の N 末端から約 68% の領域に相当する分子量約 10 kDa のタンパク質断片である。SDS-PAGE 上で得られた値は、この Em-95 の exon 2 領域に、ThioHis タグ領域の 16 kDa を加えた予想分子サイズとおおよそ一致した。

2. 組換え Em-95 抗原の血清学的反応性

組換え抗原と多包虫症患者血清との反応性はイムノプロット法により分析した。Fig. 4 に示すように、組換え Em-95 抗原は、多包虫症患者血清 12 件のうち、6 件とは強陽性反応を、5 件とは弱陽性反応を示した。残りの 1 件は陰性と判定した。このように、今回試験に用いた 12 件の血清試料のうち、11 件を陽性と判定したが、イムノプロット上でのバンド強度が高かったものはいずれも当所で行っている ELISA において高い値を示した試料であった。一般的に、発達した病巣を持つ患者血清の ELISA における値は初期段階患者のそれよりも高い。組換え Em-95 抗原に対する抗体価も、同様の傾向を示すことが推察された。一方、健常者血清 8 件とは有意な反応は示さず、多包虫症患者血清が膜上にプロットされた組換え Em-95 抗原に対

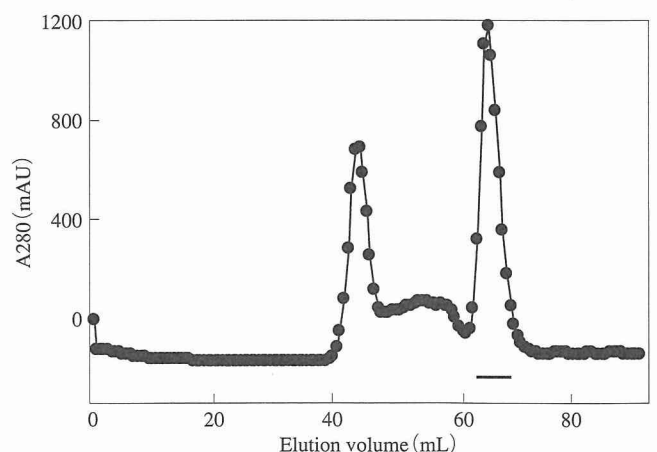


Fig. 3 Purification of the Recombinant Em-95 Antigen Using Hiload Superdex75pg Gel Filtration Column

Elution was performed with 50mM Tris-HCl buffer containing 0.15M NaCl (pH8.0) flow rate at 0.4 mL/min. The second peak fraction corresponds to the recombinant Em-95.

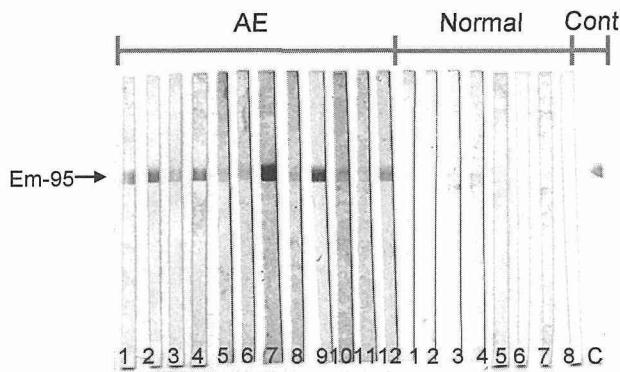


Fig. 4 Immunoblot Analysis of the Recombinant Em-95 Antigen Using AE Patient Sera

して特異的に反応することが確認された。対照として用いた、同じように中間宿主防御効果を示すことが知られている組換え 14-3-3 抗原¹⁰⁾には患者血清（4 件）、健常者血清（4 件）とも反応を示すことはなかった（図省略）。

これまで、Em-95 抗原は、中間宿主に対する感染防御効果を示すタンパク質として報告されてきた。Lightowers ら^{6,8)} は、組換え Em-95 を用いてマウスを免疫するとコントロールに比べおよそ 83%、Em-95 抗原のホモログである Eg-95 を用いてヒツジを免疫するとおよそ 98% 病巣数が減少することを報告した。Em-95 及び Eg-95 抗原がどのような機序により、その感染防御効果を発揮するのかは詳細には明らかにされていないが、これらの抗原の示す高い免疫原性により誘導された抗体が血中あるいは腸管上皮のいずれかにおいて本寄生虫の侵入を阻止していると考えられている。今回、多包虫症患者血清と組換え Em-95 抗原が有意に反応したことは患者の免疫系が、感染から発症に至るいずれかの時点で Em-95 抗原を認識していることを示している。今回の血清反応試験において、一次検診における ELISA 値の高い患者血清は、Em-95 抗原にも強く反応した。その一方で、Em-95 抗原が属するタンパク質ファミリーはシグナル配列を有し、オンコスフェラステージに特徴的に分泌されるタンパク質であることが推察されている¹¹⁾。いまだ単包及び多包虫における Eg-95

及び Em-95 の発現時期あるいは局在に関する知見はほとんど無く、どのような機序により患者血清との高い反応性が現れるのかは未知であるが、多包虫症患者の血清中に、オンコスフェラ特有の抗原に対する抗体が高い割合で産生されるとすれば、感染初期における診断精度の向上が期待される。

今後、Em-95 抗原の発現時期、局在ならびに中間宿主防御効果について研究を進めることが、診断抗原の改良を行う上で重要な知見となる可能性がある。

文 献

- 1) Pawlowski ZS, Eckert J, Vuitton DA, Ammann RW, Kern P, Craig PS, Dar KF, De Rosa F, Filice C, Gottstein B, Grimm F, Macpherson CNL, Sato N, Todorov T, Uchino J, von Sinner W, Wen H : In WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals : a Public Health Problem of Global Concern : (Eckert J, Gemmill MA, Meslin F-X, Pawlowski ZS, eds.), World Organization for Animal Health, Paris, 2002, p.20
- 2) Kouguchi H, Suzuki T, Yamano K, Honma H, Sawada Y : Protein J., 24, 57 (2005)
- 3) 川瀬史郎, 佐藤千秋, 山野公明, 鈴木智宏, 孝口裕一, 久保亜希子, 澤田幸治, 八木欣平 : 重点領域特別研究「遺伝子操作・細胞融合技術によるエキノコックス症診断抗原の生産」平成 15 年度報告書, 北海道立衛生研究所, 札幌, 平成 16 年 3 月, p.77
- 4) 孝口裕一, 鈴木智宏, 八木欣平, 加藤芳伸, 澤田幸治 : 道衛研所報, 54, 97 (2004)
- 5) Yamano K, Yagi K, Furuya K, Sawada Y, Honma H, Sato N : Jpn. J. Infect. Dis., 58, 122 (2005)
- 6) Gauci C, Merli M, Muller V, Chow C, Yagi K, Mackenstedt U, Lightowers MW : Infect. Immun., 70, 3969 (2002)
- 7) Heath DD, Lawrence BL : Parasite Immunol., 18, 347 (1996)
- 8) Lightowers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Ralston MJ, Maas D : Parasite Immunol., 18, 457 (1996)
- 9) Woollard DJ, Gauci CG, Heath DD, Lightowers MW : Parasite Immunol., 20, 535 (1998)
- 10) Siles-Lucas M, Merli M, Mackenstedt U, Gottstein B : Vaccine, 21, 431 (2003)
- 11) Lightowers MW, Gauci CG, Chow C, Drew DR, Gauci SM, Heath DD, Jackson DC, Dadley-Moore DL, Read AJ : Int. J. Parasitol., 33, 1207 (2003)