

微孢子虫 *Encephalitozoon cuniculi* の極管に対するモノクローナル抗体の確立
とプロテオーム解析による相応する抗原ポリペプチドの同定

古屋 宏二¹, 小村 麻子¹, 三和 茂², 朝倉 登喜子¹, 下河原 理江子¹, 吉川 博康³,
遠藤 卓郎¹ (¹国立感染研・寄生動物, ²イムノバイオン, ³北里大)

Establishment of monoclonal antibodies against the polar tube of
Encephalitozoon cuniculi and identification of the corresponding antigenic
polypeptide through proteome analysis

Koji FURUYA¹, Mako OMURA¹, Shigeru MIWA², Rieko SHIMOGAWARA¹, Tokiko ASAKURA¹,
Hiroyasu YOSHIKAWA³ and Takuro ENDO¹

(¹Dept. Parasitol., NIID, ²Immunobion LTD., ³Kitazato Univ., Japan)

SUMMARY

We established three hybridomas able to produce monoclonal antibodies (MAbs) against the polar tube (PT) of *Encephalitozoon cuniculi*. The reactivity of two out of the three MAbs was examined in this study. Immunoreactive proteins specifically recognized by the MAbs were analyzed using immunoproteomics. Both MAbs exhibited positive

reactions to similar multispots on 2-DE blots. Strongly positive signals were obtained from two Coomassie blue-stainable consecutive spots of identical Mr but different pI. These spots were identified as acidic protein PTP1.

[目的] 現在、微孢子虫 (Microsporidia) には約1200種の存在が知られており、このうち、ほ乳動物に感染する微孢子虫は十数種である。*E. cuculii*はその代表的病原体であり、本邦においては各種ウサギ類、リスザルで流行が確認されている。微孢子虫の特有な器官に極管(PT)があり、胞子が発芽する時胞子頂点から突出する。感染は sporoplasm がこの小管を通して宿主細胞に注入されることにより成立する。これまで幾つかの研究グループが抗 PT MAbs を作製し診断・感染機序・PT 構造の解明等に利用している¹⁾。今回、我々も新たに複数の抗 *E. cuculii* PT MAbs を作製し、それらが反応する抗原をプロテオーム解析に基づき同定したので報告する。[材料と方法] RK13細胞を用いて *E. cuculii* (遺伝子1型) 胞子を培養増殖させ、Percoll 密度勾配遠心法で精製した胞子を以下の抗原として使用した。抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには Soluble antigen (SA)-ELISA (可溶性抗原を感作) と Whole spore (WS)-ELISA (発芽胞子を含む胞子を固着) を用い、2回のクローニングを行った。プロテオーム解析では、2-D PAGE で展開させた精製胞子の主要なタンパクスポットについて、N 末端アミノ酸配列及び LC-MS/MS による解析を行い、NCBI データベースから胞子タンパクを照合・同定した (小村ら、投稿準備中)。免疫プロット解析では、2-D PAGE 抗原転写 PVDF 膜に各 MAb を室温で2時間反応させ、二次抗体 anti-mouse Ig (G+M+A) antibodies -ALP conjugate で陽性スポットを検出した。

[結果と考察] SA-ELISA 及び WS-ELISA による検索で3系統 (NID1、NID2、NID4) の抗 PT MAbs 産生ハイブリドーマを得た。二次クローニング後の培養上清の SA-ELISA/WS-ELISA 抗 PT 抗体価は NID1が256倍/128倍、NID2が512倍/256倍、NID4が512倍/512倍を示した。感染後3日目の RK13培養細胞との反応性は認められなかった。自然感染病巣ホルマリン固定・パラフィン組織切片標本に対する試験は陰性であった。また、*E. hellem* 及び *E. intestinalis* 発芽胞子との交差反応性は認められなかった。一方、2-D 免疫プロット分析において、NID1 及び NID2 MAbs は酸性側ゲルに偏在した似た多スポットパターンを与えた。最も強い反応は55 kDa 前後の2つの連続スポットに認められた。これらの同一分子サイズで PI の異なる2つの連続スポットは、プロテオーム解析で PTP1と同定された。現在、PT タンパクには PTP1の他に PTP2、PTP3が含まれることが証明されている²⁾。PTP1には13個のシステイン残基が明らかにされている¹⁾。今回の研究により、PTP1の少なくとも2つの isoform の存在が示唆されたほか、還元剤処理後の PTP1タンパク分子の一部は混成的に解離される可能性が示された。

[文献]

- 1) Delbac et al. (2001) Infect. Immunol., 69, 1016-24.
- 2) Peuvrel et al. (2002) Mol. Biochem. Parasitol., 122, 69-80.