

受理年月日	受理番号

## 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 26年 1月 30日

採択番号	25-共同-14		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津 信一郎
研究課題名	バベシア原虫メロゾイトの赤血球遊出・滑走・侵入に関わるカルシウムイオン動態のライブイメージング解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	あさだ まさひと 麻田 正仁	長崎大学・熱帯医学研究所・助教	
研究分担者	かねこ おさむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・教授	
	やはた かずひで 矢幡 一英	長崎大学熱帯医学研究所・助教	
	かわづ しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 25年 4月 1日 ~ 平成 26年 3月 31日		
目的・趣旨	<p>バベシア原虫はアピコンプレクサ門に属し、ウシなどに感染し家畜に多大な経済的損失を与える住血原虫である。マラリア原虫やトキソプラズマ原虫等、同門の原虫は宿主細胞からの脱出や侵入にカルシウムイオン (<math>\text{Ca}^{2+}</math>) を利用していることが知られている。</p> <p>申請者はウシのバベシア原虫 <i>B. bovis</i> において緑色蛍光タンパク (GFP) を発現する原虫を作出し、同原虫メロゾイトが赤血球より遊出し、滑走運動を行いながら新たな赤血球に侵入する様子を撮影することに成功した。しかしながら、バベシア原虫においてメロゾイトの宿主赤血球への遊出・滑走・侵入における <math>\text{Ca}^{2+}</math> の役割はほとんど明らかとなっていない。</p> <p>本申請課題ではバベシア原虫の宿主赤血球への遊出・滑走・侵入における <math>\text{Ca}^{2+}</math> の役割を明らかにすることを目的としている。</p>		
研究経過の概要	<p>平成 25年度は主にバベシア原虫の遊出 (エグレス) におけるカルシウムイオンの機能について解析を行った。これまでマラリア原虫やトキソプラズマ原虫においては原虫細胞内におけるカルシウムイオン濃度の上昇がエグレスを誘発することが報告されているが、バベシア原虫のエグレスについてのメカニズムはほとんど何も分かっていないのが現状であった。そこでカルシウムイオノフォア A23187 や <math>\text{Ca}^{2+}</math>-ATPase 阻害剤として知られるタブシガルギンをバベシア原虫感染赤血球に投与したところ、投与直後からの原虫感染率の有意な低下とその後の上昇が観察された。このことから、同原虫内のカルシウムイオン濃度上昇がエグレスを誘発したことが強く示唆された。さらに、エグレスにおける赤血球膜の崩壊機構を明らかとする目的で各種プロテアーゼインヒビターを原虫に投与した。その結果プロテアーゼインヒビターカクテルである cOplete 投与群において、双梨子状原虫の割合の有意な増加が見られ、赤血球膜の崩壊が阻害されたことが示唆された。本研究はバベシア原虫のエグレスの分子機構を解明する初めての試みと言える。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>バベシア原虫細胞内のカルシウム濃度上昇が原虫の遊出(エグレス)を誘発するか明らかとするため、カルシウムイオノフォア A23187 (1, 10, 100 nM) を培養感染血に投与し、投与後 10 分ごとに薄層塗抹標本を作製し、原虫感染率を測定した。その結果、A23187 10nM 投与群において投与 10 分後に感染率の有意な低下が見られ、その後、投与 20 分、30 分後においては有意な感染率の上昇が見られた。このことから、A23187 による同原虫内のカルシウムイオン濃度上昇がバベシア原虫のエグレスを誘発したことが強く示唆された。同様の現象は培養感染血にエタノールを添加した際にも起こったため、現在知られているトキソプラズマ原虫のエグレス同様カルシウム濃度上昇に関わるシグナル伝達系がこの機構に関わっていることが推測された。</p> <p>また、Ca<sup>2+</sup>-ATPase 阻害剤として知られるタプシガルギン(1.25, 2.5, 5 μM)をバベシア感染赤血球に投与しても投与直後から原虫感染率の有意な低下とその後の上昇が観察されたため、タプシガルギン感受性のオルガネラからのカルシウム放出がバベシア原虫のエグレスに関与していることが示唆された。</p> <p>現在蛍光カルシウムイオンインディケーターである Fluo-4 AM や Yellow cameleon により細胞内カルシウム濃度の上昇をバイオイメージングにて捉えることを試みている。</p> <p>さらに、エグレスにおける赤血球膜の崩壊機構を明らかとする目的で各種プロテアーゼインヒビターを培養感染血に投与した。マラリア原虫ではシステインプロテアーゼインヒビターである E64d が寄生胞膜及び赤血球膜の崩壊を阻害するとされているため、E64d を始めアンチパイン、キモスタチン、ロイペプシン(それぞれ 1, 10, 50, 100 μM)、さらにプロテアーゼインヒビターカクテルである cOmplete (Roche, 標準濃度×1, ×0.5, ×0.1 倍)を培養感染血に投与し、原虫感染率とその形態を観察した。その結果、意外な事に E64d を始めとする阻害剤では目立った変化は見られなかった一方、プロテアーゼインヒビターカクテルである cOmplete 投与群においては、×1, ×0.5 倍投与群において双梨子状原虫の割合の有意な増加が見られた。双梨子状原虫の割合の増加は感染赤血球の崩壊阻害が一因となるため、赤血球膜の崩壊が阻害されたことが示唆された。</p> <p>本実験では E64d による阻害効果が見られなかったため、同原虫におけるマラリア原虫とは異なる赤血球崩壊機構に関わる分子の存在が示唆された。こちらについては現在 cOmplete の主成分であるセリンプロテアーゼインヒビター AEBSF 投与においても双梨子状原虫の割合の有意な増加が見られるか解析中である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>原著論文 なし 国内学会発表 Calcium ions are involved in the egress of <i>Babesia bovis</i> merozoites from bovine red blood cells Mossaad Ehab、<u>麻田 正仁</u>、中谷 大地、井上 昇、<u>金子 修</u>、<u>河津 信一郎</u> 第83回日本寄生虫学会 (2014年3月、愛媛、抄録登録済み)</p>