

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 27 年 5 月 27 日

採択番号	26共同-12		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄学南
研究課題名	イヌバベシア原虫のトランスクリプトーム解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	やまぎし じゅんや 山岸 潤也	北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 准教授	
研究分担者			
	げん がくなん 玄学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 26 年 4 月 1 日 ~ 平成 27 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p><i>Babesia gibsoni</i> は宿主であるイヌの赤血球に寄生することでイヌバベシア症を引き起こす。感染によりイヌは貧血、黄疸、血色素尿などの症状を呈し、死に至る場合もある。その治療にはジミナゼン等が使用されている。しかしながら、副作用が強いことや耐性株の出現などの問題点が指摘されている。また、効果的なワクチンも開発されていない。</p> <p>前年度の原虫病研究センター共同研究では、有効な治療法や組換えワクチン開発に資する情報基盤の確立を目的に、<i>B. gibsoni</i> の全ゲノムドラフト配列を明らかにしている。</p> <p>本研究では、このドラフトゲノム配列を参照配列としてトランスクリプトーム解析を行うことで、転写領域の特定および発現遺伝子のカタログ化、さらにタンパク質コード領域の修正を行った。</p>		
研究経過の概要	<p><i>Babesia gibsoni</i> は宿主であるイヌの赤血球に寄生することでイヌバベシア症を引き起こす。感染によりイヌは貧血、黄疸、血色素尿などの症状を呈し、死に至る場合もある。その治療にはジミナゼン、アトバコン等が使用されている。しかしながら、副作用が強いことや耐性株の出現などの問題点が指摘されている。また、効果的なワクチンも開発されていない。</p> <p>一方、ゲノム情報に基づいた新規治療法や組換えワクチン開発が原虫を含む他の病原性微生物で報告されているが、<i>B. gibsoni</i> については、肝心の全ゲノムが明らかにされていない。そこで、前年度の原虫病研究センター共同研究として、<i>B. gibsoni</i> の全ゲノムドラフト配列を明らかにした。本年度の原虫病研究センター共同研究では、得られたドラフトゲノム配列に基づきトランスクリプトーム解析を行うことで、より正確な遺伝子領域を実験的に明らかにし、遺伝子機能のアノテーションの追加・見直しを試みた。</p>		

受理年月日	受理番号

原虫病研究センターにおいて *in vivo* で維持継代されている弱毒の Oita 株（別名 AZABU 株）の感染イヌ末梢血 1.5 ml（パラシテミア約 5%）から、TRIzol reagent を用いて原虫 RNA を精製・取得した。得られた total mRNA からライブラリーを作成し、Hiseq2500 により解析した（read length = 100 bp, paired end）。その結果、73,740,894 reads の配列が得られ、tophat2 を用いてマッピングしたところ、*B. gibsoni* ドラフトゲノムに 54,122,040 reads(73.4%)がマップされた。そのうち、タンパク質コード領域には 49,522,405 reads がマップされた。

続いて、遺伝子発現の量的な解析を行った（表 1）。ここで Histone 等、細胞内で大量に存在することが想像される遺伝子の発現量が上位にランクされたことは合理的である。一方、最も発現量の多かった bga005_0130 や 5 番目の bga001_3580 が、原虫を含む他の生物において相同遺伝子が存在しない *B. gibsoni* 特異的遺伝子であったことは興味深く、その機能解析と宿主特異性との関連を明らかにすることは有意義であるかもしれない。

gene	annotation	organism	p-value
bga005_0130	No hits found	-	-
bga017_1160	Uncharacterized	<i>B. bigemia</i>	3.00E-31
bga017_1130	Senescence-associated protein	<i>B. bovis</i>	5.00E-58
bga017_1140	Uncharacterized	<i>Capsella rubella</i>	6.00E-05
bga001_3580	No hits found	-	-
bga000_1490	Hsp90	<i>B. bigemia</i>	0
bga000_3320	Uncharacterized	<i>B. bigemia</i>	1.00E-18
bga005_1440	Histone H2B	<i>B. bigemia</i>	4.00E-81
bga006_1110	Actin depolymerizing factor	<i>B. equi</i>	6.00E-45
bga002_0230	Histone H4	<i>B. bovis</i>	1.00E-62

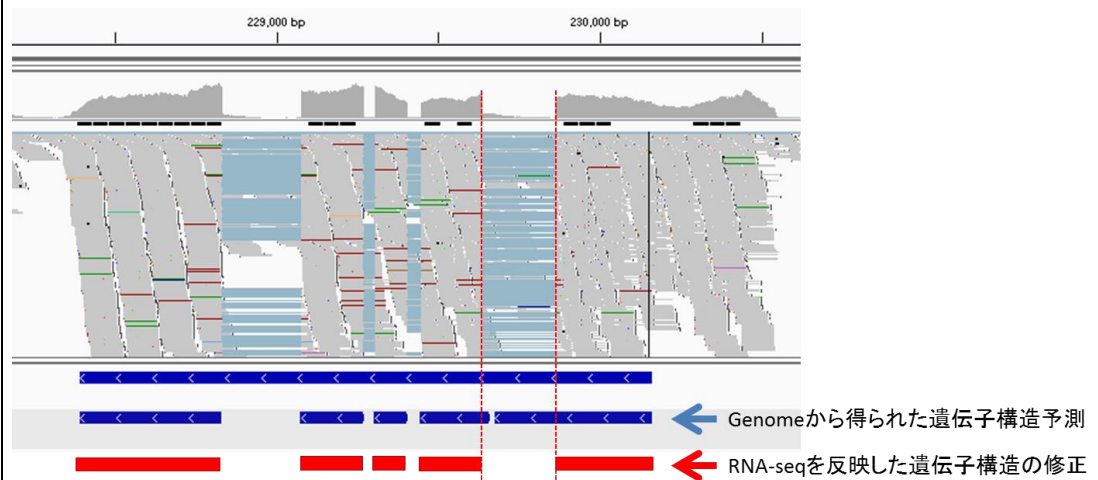
表 1. *B. gibsoni* 赤内ステージ発現遺伝子上位 10 個

続いて、得られた転写配列情報に基づいて、遺伝子構造の修正を試みた。図 1 で例示したように、ゲノム情報のみから予想された遺伝子構造と、実際に転写される領域が一致しない例が多々認められた。これは、遺伝子構造（≡タンパク質コード領域）の推定において、RNA-seq 解析を利用することで信頼性・正確性の向上が可能であることを示唆しており、今後、システムチックな解析によりアノテーション精度の向上を図ることが重要であると考えられる。

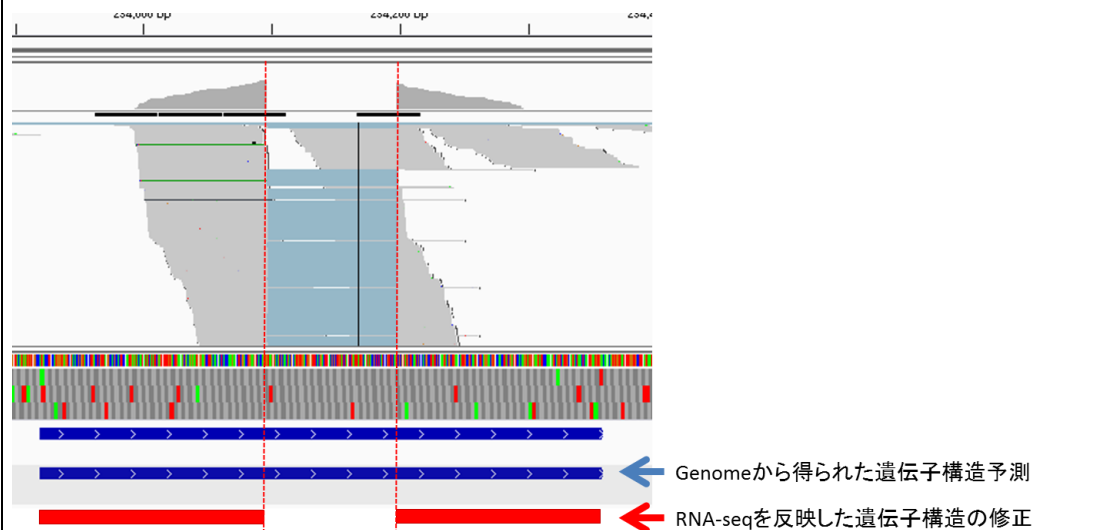
今回の解析により、より信頼性の高い *B. gibsoni* 遺伝子構造と、発現量に関する情報が得られた。これらの成果は、研究代表者が運営に関わるアプ婚プレクス門原虫転写データベース（DataBase of Apicomplexa Transcriptomes : DB-AT）にて公開済みであることから、今後、イヌバベシア症のワクチン開発や創薬、あるいは生物学的な基礎研究がおこなわれる際の情報基盤として利用されることが期待される。

研究成果の
概要

受理年月日	受理番号



第 1 イントロンが実際にはより大きいことが判明した。



イントロンが存在することが判明した。

図 1. 本研究以前のゲノム情報のみに基づく遺伝子構造予測 (青 box) と、本研究の RNA-seq 解析により修正された信頼性の高い遺伝子構造 (赤 Box) の比較。RNA-seq から得られた reads をゲノム上にマップした結果を示す (灰色線)。1 本の reads が分割してマップされた場合はその領域でスプライシングが起きている可能性が示唆される (上図の水色線)。

研究成果の
発表

DB-AT: a 2015 update to the Full-parasites database brings a multitude of new transcriptomic data for apicomplexan parasites. Jąkaliski M, Wakaguri H, Kischka TG, Nishikawa Y, Kawazu S, Matsubayashi M, Kawahara F, Tsuji N, Cao S, Sunaga F, Xuan X, Okubo K, Igarashi I, Tuda J, Mongan AE, Eshita Y, Maeda R, Makalowski W, Suzuki Y, Yamagishi J. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D631-6. doi: 10.1093/nar/gku1240. Epub 2014 Nov 20.