

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 29 年 4 月 14 日

採択番号			
研究部門	感染免疫部門	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	ヒツジバベシア原虫 <i>Babesia ovis</i> 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・役割分担	
	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			
	(原虫研共同研究担当教員名) 玄学南	帯広畜産大学原虫病研究センター (役割分担) 原虫 RNA の取得・精製	
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p><i>Babesia ovis</i> が引き起こすヒツジバベシア症は、発熱、溶血性貧血、ヘモグロビン尿症、黄疸等の症状を引き起こし、養羊業に多大な経済的被害をもたらす。その分布域は、ベクターである <i>Rhipicephalus</i> 属のマダニが生息する熱帯・亜熱帯のヨーロッパ、アフリカ、アジアと広大である。トルコにおいても当該疾病の被害は甚大であり、抗体陽性率は 32-80%、原虫検出率も 2.6-8.25% と非常に高い。治療にはイミドカルブの有用性が指摘されているが、薬剤耐性原虫の出現が懸念される。有効なワクチンもない。</p> <p>これまで申請者は、<i>B. gibsoni</i> や <i>B. ovata</i> 等、各種原虫病における、診断、薬剤標的、薬剤耐性出現メカニズム、ワクチン開発の基盤となるゲノム情報の収集・解析・公開を継続的に行ってきた。さらに、平成 27 年度原虫病研究センター共同研究により、<i>Babesia ovis</i> のドラフトゲノム配列を明らかにした。そこで今回、当該原虫の転写産物を RNA-seq 法で解析することで、転写領域および転写量に関する情報の蓄積、および、その利用によるゲノムアノテーションの精緻化を行い、診断、薬剤標的、薬剤耐性出現メカニズム、ワクチン開発に資する情報基盤の提供を試みた。</p>		
研究経過の概要	<p>トルコ共和国国立セルジューク大学の Ferda Sevinc 教授の協力を得て、<i>Babesia ovis</i> 感染ヒツジ末梢血の PAXgene RNA 溶解サンプルを入手した。当該検体から total RNA を精製し、Agilent 社 BioAnalyzer で Quality check を行い、RNAseq 解析に供試するに十分な質を保っていることを確認した。その後、ライブラリーを構築し、イルミナプラットフォーム (Miseq 300 bp paired-end) でシーケンスを行った。</p> <p>得られた配列を、H27 年度帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究採択課題「ヒツジバベシア原虫 <i>Babesia ovis</i> のゲノム解析」の成果である <i>B. ovis</i> ドラフトゲノム配列に TopHat2 を用いてアライメントした。この結果に基づき、高頻度発現遺伝子とその機能を抽出した。さらに、ゲノム配列と転写産物を比較することで高精度な遺伝子モデルの推定を可能とする tool である AUGUSTUS を用いて遺伝子モデルの更新を行い、新旧の比較を行った。</p>		

受理年月日	受理番号

発現量解析の結果、高頻度で発現していた遺伝子を表 1 に示す。機能不明遺伝子の他、ribosomal protein、surface protein D (BoSPD)の高発現が認められた。BoSPD は *B. ovis* cDNA library から cloning された遺伝子でワクチン標的としての利用が期待されている (Erster O et al., Vet Parasitol. 2015)

gene	AA length	FPKM	annotation
Bovis_v01_017_124767.path1.gene4	139	48408.8	hypothetical protein, B. bovis
Bovis_v01_021_100515.path1.gene10	134	33510.4	hypothetical protein, B. bovis
Bovis_v01_003_339620.path1.gene133	157	20873.5	ribosomal protein S27a family protein, B. bovis
Bovis_v01_058_26426.path1.gene1	265	20394.6	hypothetical protein, B. bovis
Bovis_v01_009_214136.path1.gene9	160	18025.1	translation initiation factor 5A, B. bovis
Bovis_v01_038_59623.path1.gene13	124	15489.6	ribosomal protein L35, B. bovis
Bovis_v01_002_340349.path1.gene5	305	14706.0	hypothetical protein, B. bovis
Bovis_v01_020_100570.path1.gene24	132	13600.9	ubiquitin / ribosomal protein CEP52, B. bovis
Bovis_v01_000_530468.path1.gene227	133	13307.5	hypothetical protein, B. bovis
Bovis_v01_029_75841.path1.gene7	156	12209.0	surface protein D, B. ovis

表 1

研究成果の概要

一方、AUGSUTUS により遺伝子モデル精緻化を図った結果、遺伝子数は 3756 個から 3156 個へ 16%減少したものの、各遺伝子がコードするアミノ酸の平均長が 14%伸び、延べアミノ酸数の減少は 4%にとどまったことから、分断されて推定されていた遺伝子が、AUGSUTUS により統合され、より蓋然性の高い遺伝子モデルが得られた (表 2)。また、新旧アミノ酸配列の比較を行った結果、完全一致が 54%、部分一致が 30%、新たに予想された遺伝子が 16%存在しており、AUGSUTUS による遺伝子モデルの改善効果が示唆された (表 3)。

現在、投稿論文準備中のため、結果の公開は行っていないが、論文受理と合わせて、DDBJ および、研究代表者らが運営する転写特化型のデータベース DataBase of Apicomplexa Transcriptomes (DB-AT) にて、得られた配列および遺伝子アノテーションを公開する予定である。

	original	AUGUSTUS
# of genes	3756	3156
Ave AA length	464.8	530.9
Total AA	1745916	1675513

表 2

	# of AUGSTUS genes
Perfect match	1709
Partial match	954
Newly identified	493

表 3

研究成果の発表

該当事項なし