

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 5 月 23 日

採択番号	28 共同-11		
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	<i>Babesia bovis</i> 感染赤血球における宿主血管内皮細胞接着機構の解明		
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・研究の総括、遺伝子組換え原虫作製	
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・脳性マラリアとの比較考察	
	やはた かずひで 矢幡 一英	長崎大学熱帯医学研究所・助教・細胞接着実験支援	
	はきみ はっさん ハキミ ハッサン	長崎大学熱帯医学研究所・JSPS 外国人特別研究員・遺伝子組換え原虫作製支援	
	河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授・血管内皮細胞接着分子候補の同定及び遺伝子組換え原虫の表現型解析	
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>バベシアはアピコンプレクサ門に属する原虫であり、ウシなど家畜の赤血球内に寄生することで、発熱、貧血、黄疸や血色素尿等の症状を引き起し、時に宿主を死に至らしめる。この中でバベシア・ボビス (<i>Babesia bovis</i>) によって引き起こされるウシのバベシア症では、原虫感染赤血球が毛細血管内皮細胞に接着することで脳毛細血管を栓塞し、神経症状を引き起こす「脳性バベシア症」という特徴的な病態が知られている。このように <i>B. bovis</i> は他のバベシアより高い病原性を示すが、その脳性バベシア症関連分子については <i>ves</i> 遺伝子と呼ばれる多重遺伝子(約 60 個の <i>ves-1α</i> 及び約 30 個の <i>ves-1β</i> が存在)が関わるという報告を除き不明である。我々は <i>B. bovis</i> の脳バベシア症関連分子の比較解析に応用する実験系を確立する目的で、ウシ脳毛細血管内皮細胞に接着する <i>B. bovis</i> 感染赤血球の選抜を試みた。その結果、同細胞に接着性と非接着性の原虫集団が選抜できた。そこで、本研究は脳性バベシア症における原虫感染赤血球接着機構の解明を目的として、比較トランスクリプトーム・プロテオーム解析を行い、細胞接着候補分子を探索し、それらを発現しない、または過剰発現する遺伝子組換え原虫株を作出することで、血管内皮細胞接着に関わる原虫分子を同定することを目的としている。</p>		
研究経過の概要	<p>比較解析に用いるクローンを得るため、ウシ脳毛細血管内皮細胞に接着する <i>B. bovis</i> 株のクローニングを行い、血管内皮細胞接着性の 2 クローン及び、非接着性の 2 クローンを得た。各クローンについて感染赤血球表面分子のプロテオーム解析、RNA-seq におけるトランスクリプトーム解析、電子顕微鏡による観察を行った。一連の解析により、血管内皮細胞接着株において特異的に発現している <i>ves-1α</i> 配列が同定されたため、同分子の過剰発現株の作製に着手した。</p>		

受理年月日	受理番号

研究成果の
概要

① 血管内皮細胞接着株/非接着株のクローニング

H27年度に得たウシ脳毛細血管内皮細胞に接着する原虫株についてクローニングを行い、細胞接着性の原虫 2 クローン (C1、C3) 及び血管内皮細胞にほとんど接着しない原虫 2 クローン (C2、C5、以降非接着クローンと呼ぶ) を得た。

② 感染赤血球表面分子のプロテオーム解析

ハキミ博士の外国人特別研究員奨励費にて細胞接着クローン/非接着クローンの感染した赤血球表面をビオチンで標識後に精製して質量分析に供することで、細胞接着クローン特異的に感染赤血球表面に発現している原虫由来タンパク質の同定を行った。細胞接着クローン/非接着株クローンの比較の結果、細胞接着クローンのみで検出されるタンパク質が約 50 種同定された。

③ トランスクリプトーム解析

北海道大学の山岸博士との共同研究にて細胞接着及び非接着原虫各 2 クローンについて RNA-seq 解析を行った。各クローンの *in vitro* 培養原虫から抽出した mRNA を MiSeq にて解析し、各々のサンプルについて約 20 Gb のリード長を得た。細胞接着クローン/非接着クローン間で有意に発現差が見られる遺伝子を検索した結果、約 10 種の遺伝子が同定されたが、いずれも発現差は 2 倍以下と小さかった。一方、*ves* 遺伝子の発現について比較解析したところ、*ves-1β* については 4 クローンともほぼ同じ配列の発現が確認されたのに対し、*ves-1α* については 4 クローンとも異なる配列の発現が確認された。また、*ves* 遺伝子の発現はこれまでの報告の通り、相互排他的であることが示唆された。RNA-seq データの確認のため、それぞれのクローンで発現する *ves-1α* 遺伝子に特異的な配列を基に定量 PCR 用プライマーを設計し逆転写 qPCR を行ったところ、予想通り各クローンで、それぞれに特異的な *ves-1α* 配列が排他的に発現していることが確認された。

④ 電子顕微鏡による観察

細胞接着クローン/非接着クローンの感染する赤血球について熱帯医学研究所の坂口博士の協力を得て、透過型及び走査型電子顕微鏡による観察を行った。観察から、感染赤血球表面に存在し、細胞接着効率に関与すると考えられている Ridge と呼ばれるノブ (Knob) 様の構造の形態と数に、細胞接着クローン/非接着クローン間で明瞭な差は認められなかった。

①～④の解析から、血管内皮細胞接着性には *ves-1α* が関わっていることが示唆されたため、細胞接着クローンで発現している *ves-1α* 配列の過剰発現株の作製に着手した。また、プロテオーム解析とトランスクリプトーム解析の両者において細胞接着クローンのみで発現が亢進している *ves-1α* 以外の分子が無いか精査中である。

受理年月日	受理番号

研究成果の 発表	<p>国際学会発表 [1] <u>Hakimi H</u>, Miyazaki S, Sakaguchi M, <u>Kaneko O</u>, <u>Asada M</u>. Identification of <i>Babesia bovis</i> proteins expressed on the surface of infected erythrocytes. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2016 年 9 月、兵庫県・淡路市</p> <p>国内学会発表 [1] 麻田正仁、<u>ハキミ ハッサン</u>、山岸潤也、坂口美亜子、<u>矢幡一英</u>、<u>河津信一郎</u>、<u>金子修</u> <i>Babesia bovis</i>感染赤血球の宿主血管内皮細胞接着機構の解明. 第 24 回分子寄生虫学ワークショップ&第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 2016 年 8 月、北海道・帯広市</p> <p>[2] <u>Hakimi H</u>, Miyazaki S, Sakaguchi M, <u>Kaneko O</u>, <u>Asada M</u>. Identification of <i>Babesia bovis</i> proteins expressed on the surface of infected erythrocytes. 第 5 回感染症若手フォーラム 2016 年 9 月、兵庫県・淡路市</p>
-------------	---