

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 30 年 5 月 25 日

採択番号	29-共同-2		
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	
	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	
	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 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p><i>Babesia bovis</i> によるウシのバベシア症では原虫感染赤血球が宿主の脳毛細血管に栓塞することで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が、その分子機構については殆ど分かっていない。この病態のメカニズムを解析するツールとして、私達はこれまでに、感染赤血球がウシ脳毛細血管内皮細胞に接着する原虫株と接着しない原虫株を樹立し、接着株、非接着株間でトランスクリプトーム解析とプロテオーム解析を行い、接着に関わる候補分子を絞り込んだ (H28 年度共同研究)。今年度の研究では得られた候補分子について遺伝子改変技術を用いて過剰発現ないしノックアウトを行う事により細胞接着に関わる表現型を解析し、原虫側のリガンドを同定する事を目的としている。</p>		
研究経過の概要	<p>H28 年度共同研究：比較解析に利用する実験系を確立するため、ウシ脳毛細血管内皮細胞を用いて <i>B. bovis</i> 感染赤血球のパンニングアッセイを行い、血管内皮細胞接着性の原虫集団を得た。これらについて RNA-seq 解析を行ったところ、<i>ves</i> を除く他の遺伝子の転写量差は 2 倍以下と小さいことが明らかとなった。</p> <p>H29 年度共同研究：そこで、今年度は <i>ves</i> 遺伝子の発現について精査を行った。その結果、各クローン間で発現する <i>ves-1α</i> の配列に違いが見られることが明らかとなった。<i>ves-1α</i> 配列についてはその後プライマーウォーキング法にて配列を確認すると共に、各クローンで予想された <i>ves-1α</i> 配列が特異的に発現していることを定量的 RT-PCR 法で確認した。さらに高接着性クローンで発現している VESA1α を過発現する原虫株を作製し、間接蛍光抗体法にて過発現を確認した。VESA1α 過発現原虫株を用い接着試験を行ったが、高接着性クローン、VESA1α 過発現原虫株とも血管内皮細胞に接着が見られず、</p>		

受理年月日	受理番号

	初代培養細胞である血管内皮細胞に問題があると考え、現在再試験中である。
研究成果の概要	<p>①トランスクリプトーム解析</p> <p>H28 年度に北海道大学の山岸博士と行った細胞高接着及び低接着原虫各 2 クローンについての比較トランスクリプトーム解析について精査を行った。その結果、<i>ves</i> 遺伝子以外に 10 の遺伝子についてクローン間で有意な転写量の差が見られた。しかしながら、これら 10 遺伝子の転写量の差は 2 倍以下と小さかった。一方、<i>ves</i> 遺伝子についてはゲノム上に複数ある <i>ves</i> 遺伝子の配列が互いに組換わること、実際に発現する遺伝子の多様性が確保されていることが知られている。そこで、RNA-seq データから各クローンで発現している <i>ves</i> 遺伝子の配列を推測したところ、4 クローン間で発現する <i>ves-1α</i> 配列が互いに異なる事が明らかとなった。また、この遺伝子ではクローン間で配列が異なる領域が 2 つあり、それらの比較から、ゲノム上の同じ遺伝子座の配列の一部領域が組換わったことが示唆された。一方、興味深いことに、これら 4 クローン間では <i>ves-1β</i> 配列はほぼ同一の配列が発現していることが明らかとなり、<i>ves-1β</i> ではなく <i>ves-1α</i> 配列の違いが細胞接着性の違いに関わる事が示唆された。</p> <p>② <i>ves-1α</i> の配列同定及び発現解析</p> <p>トランスクリプトーム解析から <i>ves-1α</i> の ORF 領域全長配列が推定されたため、各クローンのゲノム上で <i>VESA1α</i> の発現に使われていると予想される <i>ves-1α</i> 遺伝子座 ORF の全長配列をプライマーウォーキング法にて決定した。その結果、RNA-seq のデータから推定した配列とほぼ同じ配列がゲノム上でも同定された。また、各クローンではその <i>ves-1α</i> 配列が特異的に発現していることも定量的 RT-PCR 法で確認した。</p> <p>③ <i>ves-1</i> 過発現原虫の作製</p> <p>細胞接着クローンで発現している <i>ves-1</i> 配列を過発現させるプラスミドコンストラクトを作製し、非接着原虫クローンに導入した。トランスクリプトーム解析からは <i>ves-1α</i> のみに違いが見られたが、<i>VESA</i> タンパク質は <i>VESA1α</i> と <i>VESA1β</i> がヘテロダイマーを形成するため、<i>ves-1α</i> と <i>ves-1β</i> 両方の過発現コンストラクトを作製した。まず、GFP タグを付加した <i>VESA1α</i> 過発現プラスミドコンストラクトをゲノムに挿入する形で、また mCherry タグを付加した <i>VESA1β</i> 過発現プラスミドをエピソーム型でそれぞれ遺伝子導入した。その結果、遺伝子組換え原虫株において、ライブイメージング解析ではどちらの蛍光も観察されなかったが、mCherry 抗体を用いた間接蛍光抗体法にてタグ付き <i>VESA1β</i> の発現のみが感染赤血球細胞膜近傍で確認された。次に <i>VESA1α</i> 過発現プラスミドコンストラクトをエピソーム型で遺伝子導入したところ、抗 GFP 抗体を用いた間接蛍光抗体法にて赤血球細胞膜近傍における融合タンパク質の発現が確認された。得られた <i>VESA1α</i> 過発現原虫株を用いて血管内皮細胞接着性の変化を調べたが、血管内皮細胞への接着性が観察できず <i>VESA1α</i> 過発現による表現型の変化を検証できなかった。一方、この実験系では、陽性対照として用いた細胞高接着性の原虫クローンにおいても細胞接着が観察できなかったことから、現在、初代培養細胞である血管内皮細胞の表現型が継代培養により変化したと考え、新たな血管内皮細胞株を導入し、再試験中である。</p>

受理年月日	受理番号

研究成果の 発表	<p><u>国際学会発表</u></p> <p>[1] ○Hakimi H, Yamagishi J, Sakaguchi M, Kaneko O, Asada M. <i>ves1 a</i> genes expression is correlated with cytoadhesion of Babesia bovis to endothelial cell. The 28th Molecular Parasitology Meeting, Marine Biological Laboratory (Woods Hole, MA, USA), 2017</p> <p><u>国内学会発表</u></p> <p>[1] ○麻田正仁、ハキミハッサン、山岸潤也、坂口美亜子、矢幡一英、河津信一郎、金子修, Babesia bovis 寄生赤血球のウシ脳毛細血管内皮細胞への接着性に関する <i>ves-1α</i> 遺伝子配列, 第25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, 帯広畜産大学, 2017</p>
-------------	---