

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

令和元年 5 月 28 日

採択番号	30-共同-1		
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	
		帯広畜産大学原虫病研究センター・教授・河津信一郎	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 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、そのメカニズムについては殆ど解明されていない。この病態の分子機構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、非接着株間でのトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析を行い、これら株間で発現する <i>ves-1a</i> 配列に違いがあることを明らかにした。H30 年度の研究では、遺伝子改変技術を用いて、当該遺伝子を過剰発現した際に観察される細胞接着に関わる表現型の変化を解析し、原虫側のリガンドを同定することを目的としている。</p>		
研究経過の概要	<p>H29 年度共同研究：H29 年度は <i>ves</i> 遺伝子の発現について精査を行ったところ、各クローン間で発現する <i>ves-1a</i> の配列に違いが見られることが明らかとなった。<i>ves-1a</i> 配列についてプライマーウォーキング法にて配列を確認すると共に、各クローン毎で予想された <i>ves-1a</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 <i>ves-1a</i> 配列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。</p> <p>H30 年度共同研究：H29 年度に作製した <i>ves-1a</i> 過発現原虫の他 <i>ves-1a</i>, <i>ves-1b</i> を過発現する原虫株を複数作製し、ウシ血管内皮細胞を使った接着試験を行った。ところが、高接着性クローンで発現している <i>ves-1a</i> を過発現原虫させた株において血管内皮細胞に接着性の上昇は見られなかった。そこで、</p>		

受理年月日	受理番号

	<p><i>ves-1</i> 遺伝子座のノックアウトを行うため、発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の同定を試みた。その結果、<i>B. bovis</i> 第 2 染色体上の特定の遺伝子が <i>ves-1a</i>, <i>ves-1b</i> として発現していることが示唆される結果を得た。</p>
研究成果の概要	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>ves-1</i> 過剰発現株の作製と細胞接着試験 <p>血管内皮細胞高接着株(C1, C3)及び低接着株(C5)で発現している <i>ves-1a</i>, <i>ves-1b</i> 配列を <i>ves-1a</i> ないし <i>ves-1b</i> 単独、あるいは <i>ves1a</i>, <i>ves1b</i> 双方とも過剰発現する原虫を作出した。GFP タグを付加した <i>ves-1a</i>、mCherry タグを付加した <i>ves-1b</i> をエピソームにて過剰発現するプラスミド計 8 種類を作製し、エレクトロポレーション法にて低接着株である C2 株に遺伝子導入を行い、WR99210 にて組換え原虫の選択を行った。その結果、原虫が得られ、過剰発現した <i>ves1a</i>, <i>ves1b</i> の原虫感染赤血球表面での発現は抗 GFP 抗体、抗 mCherry 抗体を使用した間接蛍光抗体法にて確認した。</p> <p>得られた原虫を用い、ウシ脳毛細血管内皮細胞を使用した細胞接着試験を行ったところ、予想に反し、低接着株(C5)の <i>ves1a</i> を過剰発現する原虫株 1 株において細胞接着性の上昇がみられた。その一方で、高接着株(C1)の <i>ves-1a</i> を過剰発現する原虫株を含め、他の株では細胞接着性の上昇は見られなかった。また、<i>ves-1a</i> の発現量を増加させるため、培地中の WR99210 添加量を増やしたが、細胞接着性の向上は見られず、一方で培養を継続するにつれ、GFP ないし mCherry の発現が検出できない原虫の割合が増加した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の同定 <p><i>ves1</i> 過剰発現による表現型解析により予想通りの結果が得られなかったため、<i>ves-1</i> 遺伝子座のノックアウトを行うため、発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の同定を試みた。<i>ves-1</i> 遺伝子は多重遺伝子だが、Allred et al., 2012 によれば、発現している <i>ves-1</i> は LAT と呼ばれる特定の遺伝子座であることが推測されている。そこで、北海道大学の山岸博士の協力を得て C3 株の MinION による全ゲノムシーケンシングを行った。その結果、C3 株第 2 染色体上の特定の遺伝子が <i>ves-1a</i>, <i>ves-1b</i> として発現していることが示唆され、本解析により、血管内皮細胞に接着性の原虫株で発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座が初めて特定された。現在 PCR による確認とノックアウト用プラスミドの設計を行っている。</p>
研究成果の発表	<p>国際学会発表</p> <p>[1] Asada M, Hakimi H, Yamagishi J, Sakaguchi M, Yahata K, Kawazu SI, Kaneko O. <i>Babesia bovis ves1a</i> expression is correlated with cytoadhesion of parasite-infected erythrocyte to the endothelial cells. ICOPA2018, Daegu, Korea. Aug 19-24. 2018</p> <p>[2] Asada M, Hakimi H, Yamagishi J, Sakaguchi M, Yahata K, Kawazu SI, Kaneko O. <i>Babesia bovis ves1a</i> expression is correlated with cytoadhesion of parasite-infected erythrocyte to the endothelial cells. The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan. Sep 10-13. 2018</p>