

9. 共同研究成果報告書

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	
	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 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> 配列を過剰発現する原虫株を作製し、間接蛍光抗体法にて過剰発現を確認した。</p> <p>H30 年度共同研究: H29 年度に作製した <i>ves-1a</i> 過剰発現原虫の他 <i>ves-1a</i>, <i>ves-1β</i> を過剰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> を過剰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、<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-1β</i> として発現していることが示唆される結果を得た。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>・ <i>ves-1</i> 過剰発現株の作製と細胞接着試験</p> <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> をエピソード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> <p>・発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の同定</p> <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ズを行った。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>
<p>研究成果の発表</p>	<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>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 31 年 4 月 15 日

採択番号	30 共同-2		
研究部門	感染免疫研究部門 生体防御学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	哺乳動物細胞へのトキソプラズマ感染における宿主・ミトコンドリアの形態 および生理機能への影響		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	こしば たくみ 小柴 琢己	九州大学 大学院理学研究院・准教授	
研究分担者	まつお なおてる 松尾 尚輝	九州大学 大学院システム生命学府・大学院生	
	やすかわ かい 安川 開	九州大学 大学院システム生命学府・大学院生	
	西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
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>細胞内におけるエネルギー産生工場であるミトコンドリアは、真核生物の代謝系を中心に生命機能の維持には不可欠なオルガネラである。近年、ミトコンドリアの新たな役割として抗ウイルス自然免疫におけるプラットフォームとして機能していることが明らかになってきた。私たちの研究グループでは、これまでにミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫についての一貫した研究を進めおり、その生理的な重要性を世界に先駆けて明らかにしてきた (Sci. Signal 2009, 2011; PNAS 2013; Nat. Commun. 2014; Sci. Rep. 2017)。本研究の目的は、トキソプラズマを始めとした原虫に感染した宿主細胞内でミトコンドリアがどのような振る舞いをするのか、これまでに行ってきたウイルスでの知見とは異なる新たな相互作用に情報を得ることにある。一方で、原虫(感染者)側のミトコンドリアの役割にも着目し、感染前後における原虫側のミトコンドリア機能変化が宿主への病原性に及ぼす影響も理解したいと考えた。そこで、本研究では宿主および感染微生物の両者のミトコンドリアの働きに注目した、それぞれの相関解析を行った。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>これまでの先行研究(PLoS Biol. 2014)や、我々の予備知見において、トキソプラズマ感染細胞内において一部のミトコンドリアがタキゾイド周辺に集まり、あたかも特異的な相互作用が行われている様子が顕微鏡像により確認された(未発表データ)。このようなミトコンドリアの観察像がどのような生理的な意義を持つのかを生化学的、及び細胞生物学的な実験を駆使して明らかにすることを研究目的として、具体的に以下のような実験計画を行った。</p> <p>1) 宿主ミトコンドリア□原虫間における物質輸送の解析; 宿主ミトコンドリアから原虫側へ ATP やタンパク質を始めとした物量の輸送や、その逆行輸送が行われているかを細胞分画によりそれぞれを単離調製し、質量分析などから物質の特定を試みた。</p> <p>2) 宿主ミトコンドリア□原虫間の隣接の作用機序解析; 宿主ミトコンドリアと原虫の隣接に関わる両者の責任タンパク質群を同定する。トキソプラズマゲノムの相補遺伝子をクローニングした発現ライブラリー(西川研究室)を哺乳動物細胞にトランスフェクションし、発現細胞内のミトコンドリア形態を免疫染色法にて観察する。また、遺伝子改変トキソプラズマを作製し、両者隣接の作用機序を明らかにすることを試みた。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>トキソプラズマが感染細胞内で分泌する GRA ファミリータンパク質群に注目した。計 17 種類の GRA 遺伝子(FLAG タグ付加)を培養細胞に導入し、細胞分画と免疫染色法により、発現したそれぞれの GRA タンパク質の細胞内における局在解析を行った。初めに、HEK293 を用いた細胞分画法による実験では、多くの GRA タンパク質がミトコンドリアを含んだ画分に含まれていることが確認できた。そこで、三種類の培養細胞(Hela、MEF、及び A549 細胞)にこれら GRA 遺伝子を導入し、その細胞内局在を免疫染色法により詳細に調べた。その結果、GRA8、9、16、及び 25 発現細胞においてそれらの局在がミトコンドリアのマーカータンパク質と非常によく一致している像が得られた。特筆すべきは、GRA8 に関して、その発現細胞内における局在箇所の約 7 割以上がミトコンドリアと一致していた。一方、GRA9 及び 25 に関しては、一部の発現タンパク質においてミトコンドリアとの局在が観察されたが、それ以外のタンパク質においてはほぼ細胞質中に存在していた。また、GRA16 においても高い割合でミトコンドリア局在が観察されたが、大部分は核に局在していることが明らかになった。</p> <p>そこで、これら 4 種類の GRA タンパク質がミトコンドリアのどの部分に局在しているのか、その局在様式を詳細に調べるために、次に細胞分画により得られたミトコンドリア画分を高塩濃度(KCl)の緩衝液で洗浄し、その一部の画分にはプロテアーゼを添加することでミトコンドリア上に蓄積している可能性のあるタンパク質の消化実験を試みた。その結果、4 種類全ての GRA 発現細胞から得られたミトコンドリアでは、GRA タンパク質の存在が確認できなくなったことから、これら 4 種類のタンパク質は全てミトコンドリア外膜上に局在していると考えた。また、高塩濃度の緩衝液で洗浄した場合でも同様に、GRA タンパク質の存在が確認できなくなったことから、これらタンパク質は静電的にミトコンドリア膜や外膜上のタンパク質と相互作用している可能性が示唆された。最後に、これら4種類の GRA タンパク質と相互作用する宿主細胞内タンパク質を調べる目的で免疫沈降も行った。予備的な結果では、各種相互作用候補因子を確認できている。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>該当年度は、特になし。</p>

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 17 日

採択番号	30 共同-3		
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	横山 直明
研究課題名	バングラデシュにおけるタイレリア感染牛摘発技術の開発		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	たかしま やすひろ 高島 康弘	岐阜大学応用生物科学部・准教授	
研究分担者	たにぐち ゆうじ 谷口 祐二	岐阜大学・連合獣医学研究科・大学院生	
	さいとう だいぞう 齋藤 大造	岐阜大学・連合獣医学研究科・大学院生	
	もいずーる らーまん Moizur Rahman	Rajshahi Univ. Faculty of Agriculture, Associate Professor	
	よこやま なおあき 横山 直明	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	平成 30 年 5 月 9 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>ウシには数種のタイレリア (<i>Theileria</i>) が感染するが、これらを区別できる種特異的 PCR がいくつか報告されている。しかしタイレリアの遺伝子配列は種内変異があるため既報のプライマーが別の地域でもうまく機能するとは限らない。申請者らは、インドの <i>T. annulata</i> と <i>T. orientalis</i> を区別できる既報のプライマーについて、バングラデシュの原虫ではアニーリング部位に変異があるためうまく機能しないことを確認している。そこで本研究ではバングラデシュにおいて使用できる種特異的 PCR を開発し、同国におけるタイレリアの分布状況を明らかにする。総研究費の 80% 程度を占める現地調査費は他の経費でまかない、本共同研究費は検出系の開発にしばって研究をすすめる。</p>		
研究経過の概要	<p>バングラデシュのウシ血液 DNA サンプルを既報の方法に従って PCR に供し[PLoS ONE 12(3): e0174595.]タイレリア遺伝子の検出を試みたところ、報告にある種特異的プライマーでは病原性の低い <i>T. orientalis</i> と病原性の高い <i>T. annulata</i> を PCR では区別できなかった。そこで 2 組のプライマーを新たに設計し、これらのプライマーを用いればバングラデシュの sample についても <i>T. orientalis</i> と病原性の高い <i>T. annulata</i> を区別できることを確認した。これらのプライマーを用いて、症状からピロプラズマ症を疑うウシの血液 DNA を調べたところ、その一部から <i>T. annulata</i> DNA が検出された。また、無症状のウシから <i>T. annulata</i> DNA が検出された。本研究により、バングラデシュのウシにおける <i>T. orientalis</i> 感染症の存在が初めて証明された。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>バングラデシュの臨床獣医師に聞き取りを行い、近年 <i>T. annulata</i> 感染が疑われる症例が見られた農村2か所を調査地とした。これらの農村で無症状の在来牛(あるいは在来牛を親とする交雑種)60頭から採血し、DNAを得た。このDNAを新たに設計した <i>T. annulata</i> 特異的プライマーをもちいたPCRに供したところ、いずれの農村からも陽性を示す個体がみられた。陽性となったサンプルについては、改めて <i>Theileria</i> の COX3 領域をターゲットとするPCRに供し、増幅された箇所の塩基配列を決定して既報の各種 <i>Theileria</i> と比較したところ、既報の <i>T. annulata</i> の配列と99%以上の一致率を見た。系統樹を作成したところ、高いブートストラップ値で <i>T. annulata</i> とクレードを形成した。以上から、これらの個体は <i>T. annulata</i> に不顕性感染していることが分かった。さらに臨床症状から熱帯ピロプラズマ病(<i>T. annulata</i> 感染症)と仮診断された5個体の血液についても同様に解析した。このうち1頭で <i>T. annulata</i> 特異的PCR陽性となった。</p> <p>以上の成果から、バングラデシュにおける <i>T. annulata</i> の存在が初めて証明された。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>2019年5月現在、以下の論文を投稿中 Mst. Ishrat Zerine MONI, Kei HAYASHI, Thillaiapalam SIVAKUMAR, Moizur RAHMAN, Lovely NAHAR, Md. Zakirul ISLAM, Naoaki YOKOYAMA, Katsuya KITO, Cornelia APPIAH-KWARTENG, Yasuhiro TAKASHIMA. First Molecular detection of <i>Theileria annulata</i> in Bangladesh</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 31 年 4 月 12 日

採択番号	30 共同-4		
研究部門	高度診断学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	横山 直明
研究課題名	新興リーシュマニア症のリザーバー調査法の確立		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	(かとう ひろとも) 加藤 大智	自治医科大学医学部 感染・免疫学講座・医動物学部門・教授	
研究分担者			
	水島 大貴	帯広畜産大学原虫病研究センター・特任研究員	
	横山 直明	帯広畜産大学原虫病研究センター高度診断学分野・教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 4 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>リーシュマニア症は、吸血昆虫サシチョウバエに媒介されるリーシュマニア原虫によって引き起こされる人獣共通原虫感染症である。ヒト病原性のリーシュマニア原虫は約 20 種報告されており、感染種が病態(皮膚型、粘膜皮膚型、内臓型)を決定する要因となる。タイではリーシュマニア症の流行がなく、輸入感染症例しか報告されていなかった。しかしながら、10 年ほど前からタイで内臓型リーシュマニア症の国内発生がみられるようになり、原因種は 2 種の新種の原虫であることが明らかにされた。近年、新興リーシュマニア症はタイ周辺国や欧米、カリブ海諸国からも報告されており、リザーバーやベクターなど、伝播経路やリスク因子の特定は本症を制御する上では不可欠である。</p> <p>本研究は、新興リーシュマニア症の感染経路を明らかにするため、イムノクロマトグラフィによる簡便なリザーバー調査系を確立することを目的とする。</p>		
研究経過の概要	<p>新興リーシュマニア症の原因となる 2 種の原虫のうち、より多くの感染が報告されている <i>Leishmania martiniquensis</i> の K39 抗原および Heat Shock Protein 70 (HSP70) を候補抗原に選定した。これら 2 種の抗原について、大腸菌発現系により組換えタンパクを発現・精製し、また、作製した組換えタンパクを用いて、ウサギ免疫血清を得た。これらの組換えタンパク抗原および抗血清を用いてイムノクロマトストリップを作製した。陽性コントロール血清を用いて感度を検討したが、作製したストリップでは検出感度が低く、実用化にはさらなる改善が必要であると考えられた。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>本研究は、新興リーシュマニア症の感染経路を明らかにするため、イムノクロマトグラフィーによる簡便なリザーバー調査系を確立することを目的とする。</p> <p>新興リーシュマニア症の原因となる 2 種の原虫 (<i>Leishmania martiniquensis</i> および <i>Leishmania siamensis</i>) のうち、より多くの感染が報告されている <i>L. martiniquensis</i> の K39 抗原および Heat Shock Protein 70 (HSP70) を候補抗原に選定し、これら 2 種の抗原をコードする遺伝子を pET vector に組み込み、大腸菌発現系を用いて組換えタンパクを作製した。組換えタンパクは Thioredoxin-6xHistidine (Trx-His) との融合タンパクとして発現・精製した (Trx-His-LmK39, Trx-His-LmHSP70)。これらの組換えタンパクとアジュバントをウサギに免疫し、抗体価の高い抗血清を得ることができた。またイムノクロマトグラフィーに用いる抗原として、<i>L. martiniquensis</i> K39 抗原および HSP70 をコードする遺伝子を pCold vector に組み込み、6xHistidine (His) との融合タンパクとして発現・精製した (His-LmK39, His-LmHSP70)。これらの抗原と金コロイドを結合させコンジュゲートパッドを作製し、また、抗原と抗血清を原虫病研究センター所有のテストストリップ作製装置 BIODOT によりメンブレンに塗布してイムノクロマトグラフィーのストリップを作製した。陽性コントロール血清を用いて感度を検討したが、作製したストリップでは検出感度が低く、実用化にはまだまだ改善が必要であると考えられた。</p> <div style="text-align: center;"> <table border="0"> <tr> <td></td> <td colspan="3">LmK39</td> <td colspan="3">LmHSP70</td> </tr> <tr> <td></td> <td colspan="3">conc. (µg/mL)</td> <td colspan="3">conc. (µg/mL)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>200</td> <td>300</td> <td>400</td> <td>*400</td> <td>200</td> <td>300</td> <td>400</td> </tr> </table> </div>		LmK39			LmHSP70				conc. (µg/mL)			conc. (µg/mL)				200	300	400	*400	200	300	400
	LmK39			LmHSP70																			
	conc. (µg/mL)			conc. (µg/mL)																			
	200	300	400	*400	200	300	400																
<p>研究成果の発表</p>	<p>特記事項なし</p>																						

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 31 日

採択番号	30 共同-5		
研究部門	国際連携研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	加藤 健太郎
研究課題名	ロタウイルスの感染がもたらす 仔牛のクリプトスポリジウム原虫への抵抗性と免疫応答の関係		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	むらこし ふみ 村越 ふみ	京都府立医科大学・大学院医学研究科・感染病態学・助教	
研究分担者	いとう めぐみ 伊藤 めぐみ	帯広畜産大学・助教	
	(原虫共同研究担当教員名) 加藤 健太郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 32 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>畜産農家における仔牛下痢症の原因として、<i>Cryptosporidium parvum</i> およびウシロタウイルス (BRV) の腸管感染が挙げられる。BRV には産前母牛に投与するワクチンが存在するが、<i>C. parvum</i> に対するワクチン・治療薬は存在せず、激しい下痢症によって仔牛の生育不良や斃死を引き起こす。畜産現場において、両病原体の共感染は頻繁に報告される。そのため、本研究では BRV との共感染が <i>C. parvum</i> に与える影響に着目した。本研究において、仔牛へのウシロタウイルス(BRV)の顕性/不顕性感染は、その後感染する <i>C. parvum</i> による水様性下痢の日数を有意に減少させた。そこで、細胞株を用いた試験において二種の病原体のせめぎあいを詳細に調べた。</p>		
研究経過の概要	<p>本研究実験手順</p> <ul style="list-style-type: none"> ・農場における調査 <p>複数の畜産農家の仔牛から毎日直腸便を採取し、糞便性状、ウシロタウイルスを含めた各種病原体の検出およびクリプトスポリジウムの OPG (oocyst per gram) の計測を行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・細胞株を用いた調査 <p>BIE(ウシ腸管上皮)細胞に BRV および <i>C. parvum</i> を感染させ、<i>C. parvum</i> の細胞への侵入率が変化するか調べた。</p> <p>BIE 細胞に poly(I:C)をトランスフェクションし、IFNβ の発現を RTPCR にて調査した。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p><i>C. parvum</i> 単独感染仔牛 8 頭、BRV と <i>C. parvum</i> の共感染仔牛 4 頭の検体を得た。両群の結果を比較すると、BRV と <i>C. parvum</i> 共感染仔牛は、初期の OPG および下痢を呈する日数が有意に減少した。また、オーシスト排出期間は有意に長期化した。細胞での共感染実験においては、共感染区において <i>C. parvum</i> の侵入数が有意に低下した。また、poly(I:C)によって抗ウイルス応答を誘導した区においても、同様に原虫感染数が有意に低下した。</p> <p>これらから、ロタウイルスと共感染した仔牛は、<i>C. parvum</i> による下痢の症状が軽減することが明らかとなった。また、ウシ腸管上皮細胞が BRV と <i>C. parvum</i> の共感染実験に用いることができることを明らかにした。細胞株を用いた BRV と <i>C. parvum</i> の共感染実験において、BRV の感染は <i>C. parvum</i> の細胞侵入に影響を与えられた。そのため、共感染仔牛において、初期の OPG が減少していたと考えられる。</p> <p>poly(I:C)を用いた細胞株における共感染実験において、dsRNA の刺激によってウシ由来細胞から IFN が発現した。このことから、dsRNA ウイルスである BRV がウシに感染すると宿主側の抗ウイルス応答が起こり、それが仔牛の下痢の日数の減少に繋がっている可能性があると考えられた。また、poly(I:C)のトランスフェクションによって <i>C. parvum</i> の侵入数も減少したため、dsRNA の刺激は <i>C. parvum</i> の細胞侵入にも影響を与えている可能性があり、今後詳しく調べる予定である。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>さらに研究を進めた上で、学会発表、論文投稿を計画している。</p>

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-6		
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	犬バベシア症に対するニューキノロン系薬剤の有用性の検討		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いぐち あいこ 井口 愛子	鳥取大学農学部共同獣医学科獣医臨床検査学教室・講師	
研究分担者			
	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 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>犬バベシア症はマダニ媒介性赤血球内寄生原虫である <i>Babesia gibsoni</i> によって引き起こされ、重要な溶血性貧血、黄疸、脾腫および血色素尿を呈し死に至ることもある犬の重要な感染症の一つである。治療にはアトバコン(ATV)が用いられ即効性があることが知られているが、再発しその再発原虫は ATV に対する感受性が低下することが問題となっている。本研究では犬バベシア症に対する新規治療薬としてニューキノロン系薬剤に着目した。単剤での使用ならびに ATV との併用による治療効果を検討することを目的とし、<i>in vitro</i> にて培養株を用いた薬剤感受性試験を実施した。ニューキノロン系薬剤はすでに動物用医薬品の販売があり、犬に対する安全性が示されている薬剤である。</p>		
研究経過の概要	<p>2004 年に自然感染した犬から分離し、培養・維持している野生型 <i>B. gibsoni</i> 培養株を用いた。ニューキノロン系薬剤であるオフロキサシン(OFLX)およびエンロフロキサシン(ERFX)に対する薬剤感受性試験を実施した。続いて ATV とそれぞれの薬剤を併用した際の相互作用を評価した。評価後、薬剤を含まない培養液を用いて培養を続け、再増殖の有無を確認した。再増殖が認められた場合には gDNA を抽出し、ATV 耐性関連遺伝子 M121I の保有率を検出した。</p> <p>【薬剤感受性試験】 各薬剤を 2 段階希釈し、最終濃度 OFLX 0~750μM、ERFX 0~80μM となるように薬剤添加培養液を作成した。各培養液を用いて 144 時間の培養を行った。培養液は 24 時間毎に上清の 50%を交換し、48 時間ごとに血液塗抹標本を作製した。血液塗抹標本はギムザ染色を行い、赤血球 1,000 個に対する</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>感染赤血球の割合である parasitemia を算出した。その結果を基に培養後 144 時間における 50%増殖抑制濃度(IC₅₀)を算出した。</p> <p>培養後 144 時間における IC₅₀ は OFLX 94.3±5.5μM、ERFX 26.0±5.3μM であった。両薬剤共に μM レベルでの増殖抑制効果が認められた。しかし各薬剤の推奨用量における血中最高濃度(OFLX 21.0μM、ERFX 4.9μM)と比較するといずれも非常に高値であり、単剤では犬へ投与する際の投与量・毒性量が懸念された。</p> <p>【併用薬剤感受性試験】</p> <p>Modified fixed-ratio isobologram 法に基づき ATV と OFLX(ATV:OFLX 0:750、0.1:375、0.2:187、0.4:94、0.8:47、1.6:0 (μM))、ATV と ERFX(ATV:ERFX 0:100、0.1:50、0.2:25、0.4:12、0.8:6、1.6:0 (μM))の両薬剤が添加された培養液を作成した。各組合せを 2 段階希釈した培養液を用いて 144 時間培養を行い、血液塗抹標本にて parasitemia の計測を行った。その結果を基に fractional inhibitory concentration (FIC)を算出し、薬剤の相互作用を評価した。さらに薬剤を含まない培養液で培養を続け、定期的に血液塗抹標本を作製し再増殖の有無を評価した。M121I 保有率は抽出した gDNA を用いて real-time PCR 法により算出した。</p> <p>ATV と OFLX は相加効果を示し、ATV と ERFX は一部相乗効果を示したものの、大部分は相加効果を示した。両薬剤は ATV との併用が可能であること示唆された。各濃度の組み合わせの暴露後、薬剤を含まない培養液で培養を開始した。薬剤暴露後に完全に増殖抑制できていなかった組み合わせにおいて薬剤除去後 7 日では原虫が確認されなかった。しかし培養後 35 日までにはすべての組み合わせにおいて再増殖を認めた。再増殖時の M121I 保有率は 1%未満であり、ATV 単剤暴露後の再増殖時よりも低値であった。</p> <p>ATV とニューキノロン系薬剤の併用は原虫の再増殖を抑制できないものの、M121I 保有率は低値であったことから ATV 感受性低下を防ぐ効果的な併用療法であることが示唆された。また薬剤暴露中止後も増殖が抑制されたことから、ニューキノロン系薬剤は <i>B. gibsoni</i> に対し遅延死を引き起こす可能性が示唆された。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>本研究は第 161 回日本獣医学会学術集会にて口頭発表を行った。現在、英語論文の投稿準備中である。</p> <p>・第 161 回日本獣医学会学術集会 「<i>Babesia gibsoni</i> に対するニューキノロン系抗菌薬の有効性の評価」○益田美佐、井口愛子、内田直宏、小林沙織、佐藤れえ子、山崎真大</p>

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 29 日

採択番号	30 共同-7		
研究部門	国際連携部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	加藤 健太郎
研究課題名	クリプトスポリジウムタンパク質 NPPPs を標的にした薬剤開発と評価		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふるかわ あつし 古川 敦	北海道大学大学院薬学研究院・助教	
研究分担者			
	加藤 健太郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
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>クリプトスポリジウムの nonspecific polyprenyl pyrophosphate synthase(NPPPs)を標的とした薬剤開発においては、非常に弱い抗クリプトスポリジウム活性を持つ低分子化合物が以前報告されている (<i>Chem and Biology</i>, 2008)。しかし、<i>in silico</i> に基づく薬剤探索や、タンパク質立体構造を十分に吟味した探索がされたとは言い難い。本研究では、NPPPs に対して <i>in silico</i> スクリーニングや Differential Scanning Fluorometry (DSF)を用いたスクリーニングを実施し、新規阻害剤の探索を行う。さらに、<i>in vitro</i> での活性試験やタンパク質との複合体構造明らかにし、より高活性な化合物の探索を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>X 線立体構造解析や DSF 等のハイスループットなスクリーニングのための NPPPs のタンパク質発現を目指し、既報の方法に比べ安価に発現できる大腸菌発現系の構築を目指した。BL21(DE3)等の一般的な大腸菌株を用いて大腸菌で発現検討を行ったが、発現量が極めて低いことがわかった。そのため、発現量の増加を目指し、エアレーションの改善および Rosetta2(DE3)や C43(DE3)など様々な大腸菌株を用いて発現条件の検討を行った。また、精製に用いるタグの検討も行った。さらに、哺乳動物細胞 HEK293T を用いたタンパク質発現検討も行った。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>これまで各種大腸菌や哺乳動物細胞を用いた発現系を用いて NPPPs タンパク質の発現を行った。しかし、現在までのところ、結晶化の試行やスクリーニング等の生化学実験に十分な量の NPPPs タンパク質は得られていない。そのため、今後はコドンを最適化したコンストラクトの作製や昆虫細胞を用いた発現、当研究室で実績のあるカイコ発現系での NPPPs の発現検討を行う。また、近年タンパク質の立体構造解析に少量のサンプルで済むクライオ電子顕微鏡が広く利用されて来た。我々も導入したクライオ電子顕微鏡を用いた立体構造解析についても取り組みを始める。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>特になし。</p>

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 30 日

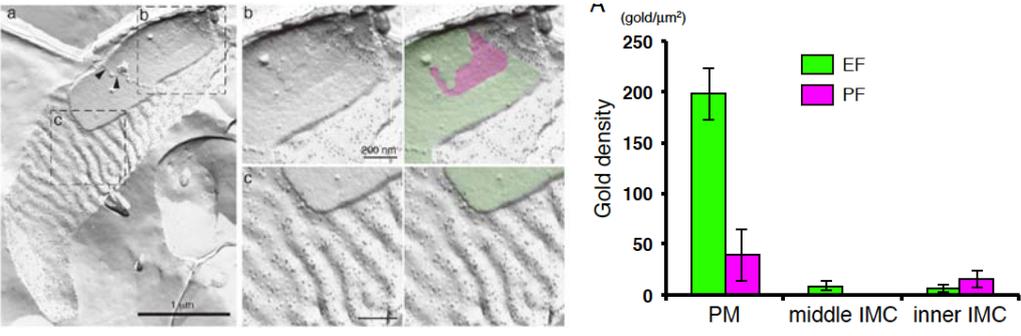
採択番号	30 共同-8		
研究部門	生体防御学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	新規抗アピコンプレクサ類原虫剤の育種による生産性向上化および バイオコンバージョンによる誘導体の創成		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	にへい こういち 二瓶 浩一	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員 研究総括と実験(抗原虫活性スペクトラムの検証)の実施	
研究分担者	いじま まさとみ 飯島 正富	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員 抗原虫剤の生産性亢進株の開発	
	どい ひろやす 土井 宏育	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・定年制研究員 抗原虫剤のバイオコンバージョン法の開発	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 抗原虫活性を持つ化合物の判定および検出系の開発	
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>アピコンプレクサ類原虫のトキソプラズマは、世界人口の約3割以上が感染していることが推定されており、その感染により、流産や新生児の先天性トキソプラズマ症を引き起こし、少子化が進む現代社会において大きな問題となっている。さらに、家畜の生産性の低下が問題視されるトキソプラズマの仲間であるネオスポラ感染による牛の流産例が全国的に見つかっており、被害の拡大が懸念される。一方、世界三大感染症の一つマラリアもアピコンプレクサ類原虫であるプラスモディウムの感染により発症し、年間3～5億人が罹患し、その内、約200万人もの命を奪う医学分野で重要な疾患である。我々はトキソプラズマをはじめとするアピコンプレクサ類原虫症に対して極めて有効と考えられるメタサイトフリリン(MCF)を発見した(特願 2017-243872)。アピコンプレクサ類原虫に対して <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> 系において優れた抗原虫活性を示す MCF は現存の方法では生産性が悪く、実用化に向けて生産方法の改善をする必要がある。本研究課題では育種による MCF の生産方法の効率化および育種による MCF 誘導体変換方法の開発を行い、新たな原虫剤の創成を行うことを目的とした。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>原虫病薬のほとんどは、市場規模が新規原虫薬の開発費を下回るため、大手の製薬企業の関心は低いのが現状である。従って、利潤に左右されない公的研究機関で抗原虫薬の探索および創薬に向けた開発を実施することが重要である。我々の研究目的は感染者数の多いトキソプラズマによる繁殖障害問題を解決するための創薬に繋がる新規技術・有用化合物を提供することにある。これまでに我々は原虫薬開発に適した天然化合物ライブラリーの構築を行い、トキソプラズマ感染マウスに対する優れた治癒効果を示す MCF を発見した。しかしながら糸状菌によって産生される MCF は、生産効率が悪く、化合物の生産性の向上化させる必要がある。MCF の実用化に向けて種々の動物実験をする必要があり、化合物量を担保することが必須である。MCF の生産性向上化および育種による構造活性相関解析に加え、他の原虫に対する抗原虫作用のパネル評価を行い、独自の新規抗原虫薬の実用化に向けた開発を実施した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>MCF はトキソプラズマおよびネオスポラの他、マラリア原虫に対する抗原虫活性を示した。MCF は既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性値を示した。さらに、MCF はクロロキン耐性マラリア原虫に対し、高い抗原虫活性を示した。世の中でマラリア既存薬に対する耐性株が出現している現状を考慮すると、MCF が次世代マラリア薬のリード化合物として発展することが期待できる。</p> <p>MCF が新たな原虫創薬における重要な意義を持つ化合物であることが明らかであるにも関わらず、既存の MCF 生産菌の育種による生産方法では、MCF の原虫に対する作用機序解析、小型および大型動物(マウス、ネコ、ヤギ、ニワトリ等)を用いた感染モデルを用いた解析を進めるのに必要な量を担保するのが困難な状況である。この現状を打開するために、低コストで且つ効率的な MCF の生産方法の開発が急務である。</p> <p>これまでの方法では、MCF 生産菌 (<i>Metarhizium sp.</i>) をリッター培養当たり MCF 収量が数 mg 程度(最大でも10mg 以下)の生産効率であった。我々の目標は精製工程を含めてリッター培養当たり100mg オーダー以上の MCF の収量を得る安定的な生産方法の開発である。本研究において、MCF 生産糸状菌への紫外線照射による突然変異導入および無機塩、アミノ酸添加物等、培地組成、培養条件の改良により、リッター培養当たり最大で約60mg オーダーの収量への向上化に成功した。本成果は大きな進展であり、MCF の実用化が期待できる結果でもあった。今後は精製工程を含め、リッター培養当たり100mg オーダーの MCF 収量を目指し、研究を進める予定である。一方、育種法により MCF のフェニル基にハロゲンの導入を試みた。その結果、ハロゲンがフェニル基の位置特異的に導入されることを確認し、フッ素を導入した MCF 誘導体の作成に成功した。フッ素の導入により高い抗原虫活性が得られることを期待したものの、実際にその抗原虫活性は MCF に比べて1/20程度であった。しかしながら、育種法により MCF の誘導体展開が可能であることが明らかとなり、今後も育種法による MCF の誘導体化による新規創薬の開発につなげていく予定である。</p> <p>本研究課題の成果により、有効な治療法および予防法が存在しない当該感染症対策に大きく貢献できると捉えている。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>該当なし</p>

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 24 日

採択番号	30 共同-9		
研究部門	生体防御学	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	トキソプラズマ虫体細胞膜の生体膜構成脂質をナノスケールレベルで可視化する		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	まさたに たつのり 正谷 達膳	鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター・准教授	
研究分担者	ふじた あきかず 藤田 秋一	鹿児島大学共同獣医学部分子病態学分野・教授	
	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 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>昨年度の本共同研究課題を実施する過程において、トキソプラズマがラフト・カベオラを持たない可能性が示唆された。そこで、本年度はその確認をさらに実施するとともに、ラフト・カベオラマーカに限らず、膜蛋白質などの原虫表面における局在様態を解析する。昨年度に引き続き、トキソプラズマを対象として凍結切断レプリカ法ならびに脂質成分特異的標識法を組合せ、電子顕微鏡によるナノスケールレベルでの分子観察を行う。トキソプラズマの生体膜を破壊すること無く可視化し、さらに構成する機能性膜蛋白質の局在のマッピングを目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>1. 急速凍結切断レプリカ法を用いて、膜レプリカを作製した。すなわち、トキソプラズマ RH 株及び PLK 株を精製し、これを金箔へ接着させ、瞬時に液体窒素によって急速凍結した。このようにして原虫細胞膜を金箔へ接着させ、金箔ごと脂質二重膜のうち外側の膜をナイフで削り取った(凍結切断)。むき出しになった内側の膜へカーボンを蒸着することで、脂質レプリカを作成した。</p> <p>2. トキソプラズマの虫体表面に存在する表面蛋白質 SAG1 に対する抗体および金コロイド標識二次抗体を用いて、本膜レプリカを標識したところ、原虫細胞膜表面の広範囲にシグナルを認めた。なお、インナーメンブレンコンプレックス(IMC)や、細胞膜の P 面にはほとんど認められなかった。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>SAG1 は GPI アンカー蛋白質に分類される。哺乳類では GPI アンカー蛋白質は脂質ラフトに存在するとされる。上述の通りトキソプラズマがラフトを持たないことが示唆されたため、SAG1 の細胞膜上の分布様式も哺乳類細胞とは異なることが示唆される。そのため、金コロイド標識した SAG1 の分布を解析した。その結果、SAG1 は他の生物の GPI アンカー型蛋白質のように膜表面の部分部分に散在するのではなく、その分布は一様であった。</p>  <p>図 1: (左)トキソプラズマ表面における SAG1 の分布。黒いドットが金コロイド標識された SAG1 を示す。(右)SAG1 の密度。PM:細胞膜;EF:E 面;PF: P 面。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>正谷 達膳、富奥 甘奈、藤田 秋一「急速凍結・凍結割断レプリカ標識法を利用したトキソプラズマ虫体における免疫電顕法の適用」第 161 回日本獣医学会学術集会、つくば国際会議場、2018 年 9 月 11 日</p> <p>Yuna Kurokawa*, Tatsunori Masatani*, Rikako Konishi, Kanna Tomioku, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita. Nanoscale analysis reveals random distribution of GPI-anchored protein SAG1 in the membrane of living <i>Toxoplasma gondii</i> (投稿中)*contributed equally</p>

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 22 日

採択番号	30 共同-10		
研究部門	感染免疫研究	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	マラリア原虫の媒介蚊体内ステージにおけるオーシスト形成機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いかだい ひろみ 筏井 宏実	北里大学獣医学部・准教授 研究総括	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
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>マラリア原虫は、宿主動物の赤血球に寄生しているガメサイトが媒介者である蚊に吸血されると、蚊中腸内において雌雄ガメト、ザイゴートを経て運動能を有するオーカイネートに分化する。オーカイネートは、蚊中腸細胞に侵入して基底膜下に到達した後、オーシストへ形態変化を開始する。</p> <p>マラリア原虫の生活環において媒介蚊体内ステージ、特にオーカイネートからオーシスト形成初期の 1-2 日間は、宿主の環境が大きく変化する事ことから原虫はその変化に対応しつつ形態も劇的に変化させる。さらに、この期間は生存する原虫数が最も減少する、原虫の生き残りにとって非常に重要なステージである。</p> <p>オーシスト形成初期では、まずオーカイネートの細胞膜の構造が変化して早期オーシスト壁が形成され、徐々にオーシスト壁は殻のような特殊な構造物を構成して、成熟オーシストとなると考えられているが、その詳細については不明な点が多い。</p> <p>本共同研究では、オーシストに特有な壁構成蛋白質を探索し、そのオーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析を実施することにより、オーシスト形成機構の解明を目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>本研究手順は、オーシスト形成期における、①オーシスト壁構成蛋白質の探索、②オーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析、および、③原虫オーシスト形成期と媒介蚊中腸細胞の相互因子の解析を行なう事によって実施されている。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>本年度は、壁形成に重要と思われる蛋白質を5種スクリーニングした。スクリーニングした蛋白質に対する抗体をそれぞれ作製し、抗体とマラリア原虫感染血液を媒介蚊に吸血させた所、2種類の蛋白質(PbCap184 および PbCap494)に対する抗体が吸血後のオースト形成数を減少させ、伝搬阻止効果があることが明らかとなった。さらに、上記2種類の蛋白質について、それぞれ遺伝子欠損(KO)原虫、過剰発現(OE)原虫および Tag 蛋白質発現組換え原虫の作製を試みた。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>— PbCap184 蛋白質 —</p> <p>① <u>新たに4種類の異なるエピトープに対する抗体の作製</u> 先に作製した伝搬阻止効果のある抗体と新たに作製した4種類の抗体の計5種類の抗体について伝搬阻止試験を実施し、そのエピトープの違いによる反応性を比較検討中である。</p> <p>② <u>遺伝子欠損原虫および Tag 原虫の作製</u> PbCap184 遺伝子の KO 原虫作製を試みたが、赤内型において lethal な遺伝子であることが明らかとなった。そこで、MSP9 プロモータを用いた、コンディショナル KO 原虫の作製を試みクローニングに成功し、赤内型および蚊体内ステージにおける表現型について解析中である。</p> <p>— PbCap494 蛋白質 —</p> <p>① <u>PbCap494 蛋白質の遺伝子欠損(KO)原虫および過剰発現(OE)原虫の作製</u> 野生型(WT)原虫の蚊体内ステージにおける PbCap494 の mRNA 発現動態をリアルタイム PCR にて調べたところ、吸血後 48 時間目において急激に発現を始め、その後は発現量が増加し続けていた。 WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫の赤内型および蚊体内ステージについて比較したところ、赤血球内寄生率の増加、gametocyte 形成率、雌雄 gametocyte 比、exflagellation 数、ookinete 形成数および ookinete の形態について差は見られなかった。さらに、28 日目以降の蚊の唾液腺から sporozoite を分離し、その運動性およびマウスへの感染能についても解析を行ったが差は見られなかった。 WT 原虫、KO 原虫および OE 原虫を感染させて吸血後 13~14 日目のそれぞれの蚊中腸の oocyst 形成数および大きさを比較した所、KO 原虫において oocyst 形成数は減少し、大きさも小さかった。透過型電子顕微鏡による観察を行ったところ、KO 原虫および OE 原虫の oocyst は WT 原虫に比べて発育が遅延していた。さらに、KO 原虫の oocyst 壁は WT 原虫に比べて菲薄化していた。 以上、PbCap494 は蚊体内ステージにおける初期の oocyst 壁形成に関与していると推察された。</p> <p>② <u>抗 PbCap494 抗体を用いた局在解析および運動性試験</u> 抗 PbCap494 抗体を用いて間接蛍光抗体により PbCap494 の ookinete 細胞膜における局在解析を行った。ookinete は PFA 固定/TritonX-100 処理および PFA 固定/未処理、生鮮状態のものを用いた。いずれも PbCap494 が ookinete の細胞膜表面で強く反応していた。 抗 PbCap494 抗体と反応させた ookinete と抗体未反応の ookinete の運動性を比較したところ、抗 PbCap494 抗体と反応させた ookinete の運動性は明らかに低下していた。以上、PbCap494 は ookinete の細胞膜表面に発現し、運動性に関わるタンパク質であると示唆された。</p>
<p>研究成果の発表</p>	

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 22 日

採択番号	30-共同-11		
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	菅沼 啓輔
研究課題名	モンゴル国薬用植物による現地家畜トリパノソーマ症・ピロプラズマ症対策		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	むらた としひろ 村田 敏拓	東北医科薬科大学・薬学部・講師 モンゴル国薬用植物の成分薬効解析、合成、現地調査	
研究分担者	なりた こういち 成田 紘一	東北医科薬科大学・薬学部・助教 有力な活性が見られた化合物の化学合成	
	ブヤンヒシグ Buyankhishig B.	東北医科薬科大学生薬学教室・博士課程(後期)大学院生 化合物の単離精製・試料調整、現地情報の調査	
	いがらし いくお 五十嵐 郁男	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授 抗ピロプラズマ活性試験	
	(原虫研共同研究担当教員名) 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教 抗トリパノソーマ活性試験、動物実験	
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>モンゴル国は畜産業が経済の基幹を担う産業の一つであるが、年によっては深刻な雪害により広範囲の地域で家畜が死滅するなどモンゴル国に特有の問題が山積している。この状況の中で感染性原虫病が及ぼす影響も極めて大きく、原虫病に感染し体力を消耗したため冬を越せない、あるいは商品価値を失う個体が数多く存在する。</p> <p>一方で同国には 1,400 種を超える薬用植物が知られており、そのユニークな点としてヒトの疾病ばかりでは無く、家畜動物を対象にした様々な薬効も伝承されていることが挙げられる。また牧草としての使い方、注意点なども知られている。</p> <p>申請者は一貫してそのような伝承に基づいた成分薬効解析研究によりモンゴル国植物資源の有効活用を試みており、H28 年度から継続的に帯広畜産大学菅沼啓輔助教との共同研究を展開している。</p> <p>本共同研究では地域の資源と伝承を最大限に活用した即効性ある原虫病対策を、科学的根拠を明示した上で提案することを第一の目標としてモンゴル国薬用植物とその抗原虫活性化合物の応用に向けた研究に取り組んでいる。また今年度(30 年度)からは合成化学の専門家成田紘一助教もチームに加わり、一連のスクリーニングによって明らかになった有力な活性化合物をシーズとして、関連化合物を合成する。これにより構造活性相関を検討することでより高い効果が見込める化合物を示すことを発展的目標とする。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>平成 28, 29 年度 (28-joint-12, 29-joint-6)からの継続課題となり、当課題でも引き続き抗トリパノソーマ活性化合物ならびに抗ピロプラズマ活性化合物の探索を実施した。また今年度からこれまでのスクリーニングによって有力な活性を示した化合物及びその関連化合物の合成を試み、構造活性相関について検討した。</p> <p>抗ピロプラズマ活性化合物の探索 シベリアを含むロシア、中国、モンゴルにかけて広く分布し、多様な薬効が伝承されるユキノシタ科植物の <i>Bergenia crassifolia</i> から牛などのピロプラズマ症の原因となる <i>Babesia bovis</i> 及び <i>B. bigemina</i> に対して生育阻害活性を示す化合物を得た (業績 1)。ここでの活性化合物に共通する化学構造の特徴としてガロイル基を有することが挙げられ、これは昨年度の成果で報告した <i>Saxifraga spinulosa</i> 由来活性成分で得た考察 (<i>J. Nat. Prod.</i> 2017, 80, 2416-2423)と一致した。 次に、モンゴル国の早春に他の植物に先んじて花を咲かせ、家畜やヒトの強壯につながるとされる <i>Pulsatilla flavescens</i> から馬などのピロプラズマ症の原因となる <i>Babesia caballi</i> 及び <i>Theileria equi</i> に対して生育阻害活性を示す化合物を得た (業績 2)。</p> <p><i>Brachanthemum gobicum</i> 由来抗トリパノソーマ活性リグナン モンゴル国ゴビ砂漠に分布するキク科 <i>Brachanthemum gobicum</i> はそれを乾燥したものを燃やし、その煙で家畜動物を燻すことで体表寄生虫を除去する目的で用いるユニークな有用植物として知られている。本植物から抗トリパノソーマ活性 (<i>Trypanosoma congolense</i>)を示す 9 種類のアシル化リグナンを見出した。ここで得たアシル化リグナンはラセミ混合物として存在していることをキラルカラムにより分離することで示し、分光学的データを測定した (業績 3)。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>抗原虫活性成分の探索について</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 牛などのピロプラズマ症の原因となる原虫 <i>Babesia bovis</i> 及び <i>B. bigemina</i> に対して生育阻害活性を示す <i>Bergenia crassifolia</i> 由来成分を見出し、新規化合物 2 種類の化学構造決定とともに報告した (業績 1)。 2. 馬などのピロプラズマ症の原因となる原虫 <i>Babesia caballi</i> 及び <i>Theileria equi</i> に対して生育阻害活性を示すフラボノイド類をモンゴル国でヤルホイと称し強壯作用が知られる植物 <i>Pulsatilla flavescens</i> から見出し、新規フラボノイド 3 種類の化学構造決定とともに報告した (業績 2)。 3. 抗トリパノソーマ活性 (<i>Trypanosoma congolense</i>)を示す <i>Brachanthemum gobicum</i> 由来アシル化リグナンを見出した。またここで得た一連の新規リグナン関連化合物はいずれもラセミ混合物として存在することを示した (業績 3)。

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>モンゴル国での応用に向けた取り組みについて 昨年度までと同様に抗原虫活性成分を含む植物について、現地協力者のもと植物分布調査や家畜動物との関係性の調査を進めた。更に活性化合物の細胞毒性の評価や実際にモンゴル国で分離・樹立された媾疫トリパノソーマ培養馴化株を用いた抗トリパノソーマ活性評価試験の実施を開始しており、モンゴル国の問題をモンゴル国の資源で解決するための応用研究の展開に結び付いている。</p> <p>化学合成による構造活性相関の追究について 本課題における一連のスクリーニング結果のうち、有力なトリパノソーマ活性を示した化合物について、成田紘一博士によって化学合成が試みられた。今後は構造活性相関の追究とより効果が高く低毒性の化合物を見出すべく継続的に合成研究を進める予定である。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p><原著論文></p> <p>1) Chemical constituents of <i>Bergenia crassifolia</i> roots and their growth inhibitory activity against <i>Babesia bovis</i> and <i>B. bigemina</i>, Orkhon Banzragchgarav, *Toshihiro Murata, Bumduuren Tuvshintulga, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Noboru Inoue, Javzan Batkhoo, Kenroh Sasaki, <i>Phytochemistry Letters</i>, 29, 79-83 (2019). DOI: https://doi.org/10.1016/j.phytol.2018.11.009</p> <p>2) Flavonoids isolated from the flowers of <i>Pulsatilla flavescens</i> and their anti-iroplasm activity, Dorj Ganchimeg, Badarch Batbold, *Toshihiro Murata, Bekh-Ochir Davaapurev, Tserendorj Munkhjargal, Bumduuren Tuvshintulga, Keisuke Suganuma, Ikuo Igarashi, Buyanmandakh Buyankhishig, Kenroh Sasaki, Dulamjav Batsuren, Javzan Batkhoo, <i>Journal of Natural Medicines</i>, On the web. DOI: http://doi.org/10.1007/s11418-019-01294-8</p> <p>3) Acylated lignans from <i>Brachanthemum gobicum</i> and their trypanocidal activity, Batsukh Odonbayar, *Toshihiro Murata, Keisuke Suganuma, Yoshinobu Ishikawa, Buyanmandakh Buyankhishig, Javzan Batkhoo, Kenroh Sasaki, <i>Journal of Natural Products</i>, 82, 774-784. DOI:10.1021/acs.jnatprod.8b00670</p> <p><シンポジウム> The Japan-Mongolia Joint research meeting, Toshihiro Murata, The Research Project of Mongolian Medicinal Plants, Ulaanbaatar, Mongolia, 2018年8月</p>

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 29 日

採択番号	30-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	フタトゲチマダニゲノムがコードする遺伝子の機能予測		
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 シーケンシング、バイオインフォ解析	
研究分担者	しらふじりか 白藤 梨可	帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教 フタトゲチマダニ試料およびトランスクリプトームデータの提供	
	(原虫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・教授 研究助言	
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>吸血性節足動物であるマダニ類は、吸血自体による不快感・障害に加え、SFTSV(重症熱性血小板減少症候群ウイルス)、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、回帰熱、ボレリア類等を媒介するベクターとしても軽視することのできない衛生害虫である。国内のマダニ類では、フタトゲチマダニ(<i>Haemaphysalis longicornis</i>)が優占種の1つとされ、SFTSV の他、Q 熱(コクシエラ)、日本紅斑熱(リケッチア)の病原体を媒介する。さらに、バベシア原虫のベクターでもあり、人のみならず、畜産業にも多大な経済的被害をもたらしている。これらの対策立案を想定した際、マダニのゲノムは、疫学・殺ダニ剤開発・組換えマダニワクチン開発等、広範囲にわたる研究・開発を行う上での基盤情報となりうるが、国内優占種であるフタトゲチマダニについては、ゲノム情報に関する基盤整備が極めて不十分であるのが実情である。このような背景から我々は、帯広畜産大学で長期にわたり維持されているフタトゲチマダニのコロニーを材料に、ドラフトゲノムの解析に着手した。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>これまで、Illumina 社製次世代シーケンサーを用いて、142Gb のフタゲチマダニ由来配列を取得している。しかしながら、k-mer 法から、そのゲノムサイズは 8.3-8.8Gb と推定され、一般に <i>de novo genome assembly</i> に必要な x30~x50 の深度に満たないことが判明した。実際に、ABYSS を用いてアセンブルを試みたが、得られたゲノムは、最も良い成績でも総塩基 6.3 Gb、contig 数 20.7 M、N50 が 701bp と、向上の余地を大きく残すものであった。</p> <p>そこで今回、同じく Illumina 社製次世代シーケンサーで、146Gb の塩基を追加取得し、基準である x30 を上回るデータの取得に成功した。さらに、近年利用可能となった超長鎖出力を可能とする次世代シーケンサー MinION を導入、3 回の Run により 4.5Gb を取得した。これらを材料に再度 <i>de novo genome assembly</i> を試みたが、巨大なデータの使用に解析サーバーが耐えられず、これまでのところ良好な結果は得られていない。現在、解析パイプラインの見直しによる計算の効率化、MinION リードの追加取得と断片からの遺伝子予測の可能性を検討している。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>研究分担者の白藤博士よりフタゲチマダニより精製したゲノム DNA の供与を受け、ケミカル同仁社が提供する次世代シーケンシング受託サービス” GeneNex”を利用し、150 塩基ペアエンド計 146.1Gb、891 Mreads の塩基配列を得た。これに前年度までに取得した 141.6Gb を加えた 287.7 Gb、1.89 Greads を <i>de novo genome assembly</i> を行うためのデータとして用意した。これは、8.3-8.7 Gb と推定されるフタゲチマダニゲノムの x33~x35 の深度にあたり、十分なデータ量と考えられる。そこで、最初に Quality trimming を行い、質の保たれた 265.7 Gb、1.83 Greads を確保した。次に、ABYSS を用いて、assembly を試みたが、恐らくメモリ不足により結果を得ることはできなかった。</p> <p>一方で近年、超長鎖配列の出力を可能とする次世代シーケンサー、MinION の利用が可能となった。この超長鎖配列は <i>de novo genome assembly</i> において、integrity の向上に大きく寄与することが知られている。そこで、本研究においても、本シーケンサーを利用し、FLO-MIN106 を 1 枚、FLO-MIN107 を 2 枚の計 3 枚を用いて 4.5 Gb、3.3 Mreads を取得した。しかしながら、今回取得した総データ量はフタゲチマダニの推定ゲノムサイズにも満たず、<i>de novo genome assembly</i> に用いるには、追加データの取得が必要と考えられる。</p> <p>今後、フタゲチマダニの <i>de novo genome assembly</i> を成功させるために、以下の方法が考えられる。まず、MinION を用いた超長鎖配列の追加取得については、コストパフォーマンスに優れた PromethION の利用を視野に入れる。一方、Illumina 社製次世代シーケンサーで取得した短鎖配列については、十分なデータ量を取得しているため、情報解析方法を工夫する必要がある。具体的には、北海道大学情報基盤センター大型計算機システムの利用、BBnorm を用いた短鎖配列のカバレッジのノーマライズによるデータ量のダウンサイジング、Velvet 等の ABYSS 以外のアセンブラーの使用が考えられる。とくに情報解析は大きな予算を必要としないため、プロジェクト終了後も継続して進めたい。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>特記事項無し</p>

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 31 日

採択番号	30 共同-13		
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	白藤 梨可
研究課題名	<i>Spiroplasma</i> 属共生菌導入マダニを用いたマダニ共生細菌の維持機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なかお りょう 中尾 亮	北海道大学大学院獣医学研究院・准教授	
研究分担者	おがた しょうへい 小方 昌平	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	まつお かい 松尾 權	北海道大学獣医学部・学部学生	
	まつもと たてき 松本 干城	北海道大学獣医学部・学部学生	
	白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教	
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>マダニは体内に多様な微生物を保有するが、その一部は共生細菌としてマダニの生命活動に重要な役割を持つことが知られつつある。申請者は、マダニの持つ微生物群をメタゲノム解析手法により特定し、特にマダニ集団内で多くを占める細菌群について、マダニ体内での役割解析を進めている。これまでの共同研究で、マダニの共生菌の一つである <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の単為生殖系フタゲチマダニ(原虫研累代飼育株・岡山株)への接種試験を行い、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌が介卵伝播することを確認した。本研究では、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌を両性生殖系フタゲチマダニ(原虫研累代飼育株・大分株)に接種し、その体内での局在と宿主マダニの表現型への影響を評価することを目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>北海道で採集されたシュルツェマダニ(<i>Ixodes persulcatus</i>)からマダニ細胞(ISE6)を用いて分離した <i>Spiroplasma</i> 属共生菌(Sp1-1 株)を実験に用いた。本菌は、昨年度実施した共同研究において単為生殖系フタゲチマダニの成ダニにマイクロインジェクションにより投与することで、成ダニ体内に定着し、その成ダニが産卵した卵に移行することを確認している。本実験では同様のプロトコールにより <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を両性生殖系フタゲチマダニに投与した。接種後のマダニはウサギを用いた吸血に供し、産卵に至るまでの日数、卵重量、飽血時体重飽血後体重を測定した。また、卵から DNA を抽出し PCR により <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の感染有無を評価した。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>SP-4 無細胞培地で培養した菌体を 2 種類の濃度 (A と B (A は B の 100 倍の菌体量)) に希釈し、A 希釈菌液をオス 23 個体、メス 27 個体に自動マイクロインジェクターにより接種した。同様に、B 希釈菌液をオス 26 個体、メス 45 個体に接種した。また、陰性コントロールとして、PBS をオス 29 個体、メス 60 個体に接種した。交配の組み合わせから、以下の 8 群を準備した。①非接種オス+非接種メス、②PBS 接種オス+PBS 接種メス、③A 菌液接種オス+A 菌液接種メス、④B 菌液接種オス+B 菌液接種メス、⑤A 菌液接種オス+PBS 接種メス、⑥B 菌液接種オス+PBS 接種メス、⑦PBS 接種オス+A 菌液接種メス、⑧PBS 接種オス+B 菌液接種メス。合計 102 個体のマダニを用い、合計 4 羽のウサギを用いて吸血試験に供した。</p> <p>産卵に至るまでの日数、卵重量、卵重量と飽血時体重の比を評価したところ、コントロール群 (①および②) と比較して、③群で卵重量と雌飽血時体重の比の低下が見られた。また、卵の一部を取り分け、DNA を抽出し 16S リボソーム RNA 遺伝子をターゲットとした特異的 PCR により <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の感染有無を評価した。その結果、全ての接種群において <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の遺伝子は検出されず、両性生殖系フタゲチマダニにおいては、介卵伝播がみられなかった。</p> <p>以前に行った単為生殖系フタゲチマダニを用いた <i>Spiroplasma</i> 属共生菌接種試験では、接種菌液中に抗生物質 (ペニシリン・ストレプトマイシン) が含まれていた。その結果、フタゲチマダニが保有する <i>Coxiella</i> 属細菌の卵への伝播率の低下が観察されるなど、フタゲチマダニが本来持つ細菌群の攪乱が示唆された。今回の接種菌液中には抗生物質は含まれていなかった。仮説の一つとして、マダニ体内の微生物叢が安定した条件下では、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌の外部導入が困難となったことが考えられた。本仮説が正しい場合、投与する抗生物質の種類や量の条件検討することでマダニが保有する微生物叢を操作できる可能性を示すものであり、マダニと微生物の相互関係を解析する上で、優先して取り組む課題を提起したこととなる。また、別の仮説として、単為生殖系と両性生殖系で <i>Spiroplasma</i> 属共生菌に対する感受性が異なり、両性生殖系では <i>Spiroplasma</i> 属共生菌感染に抵抗性をもつことが考えられた。今後、抗生物質不使用条件下において単為生殖系フタゲチマダニに <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を投与する実験を行うことで、両方の仮説を検証する必要がある。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>なし</p>

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 31 日

採択番号	30 共同-14		
研究部門	地球規模感染症学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	加藤 健太郎
研究課題名	クリプトスポリジウム症発症メカニズム解明に向けた形態学的アプローチ		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ぼちもと ひろき 暮地本 宙己	帯広畜産大学保健管理センター・特任准教授	
研究分担者	こんどう だいすけ 近藤 大輔	帯広畜産大学基礎獣医学研究部門獣医解剖学研究室・助教	
	加藤 健太郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
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>クリプトスポリジウム症は、ヒトにおける最も重要な人獣共通感染症の一つであるが、ヒトへの感染性や発症メカニズムには不明な点が多く、その解明のためにクリプトスポリジウムの微細構造を含む形態学的知見を確立する必要がある。本研究ではクリプトスポリジウム感染モデルマウス腸管組織の微細構造解析を行うことで、ヒトのクリプトスポリジウム症の診断や治療、予防法研究のための基本的知見を得るとともに、マウス動物モデルにおける感染様式に関する形態学的基盤の強化を目的として実施した。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>原虫病研究センターにおいて <i>Cryptosporidium parvum</i> を感染させた SCID マウスモデルを作製した。感染後 2 週間を経過し胃腸症状を呈しているモデルマウスより腸管組織を採取後、0.5% Paraformaldehyde (PFA)・0.5% Glutaraldehyde (GA)・0.1 M phosphate buffer (PB)にて 30 分間の浸漬固定を実施した。その後腸管組織の一部については 2% GA・0.1 M PB にて 2-3 日間追加固定した後に 1%四酸化オスミウム溶液にて後固定し、常法に従い L.R.White 樹脂に包埋した。L.R.White 樹脂包埋標本より 0.5 μm 厚の準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色を施して光学顕微鏡観察に供した。また同標本より 70nm 厚の超薄雪片を作製し、酢酸ウランを用いた電子染色を施して透過電子顕微鏡観察に供した。さらに腸管組織の一部については、0.5% PFA・0.5% GA・0.1 M PB への浸漬固定後、ただちに 1%四酸化オスミウム溶液にて後固定した。その後段階的に濃度を上昇させた DMSO 溶液に浸漬して氷晶防止処置を施し液体窒素中で凍結切断を実施した。凍結切断後の試料を 0.1%四酸化オスミウム溶液にてオスミウム浸軟処理を実施した後、1%四酸化オスミウムおよび 1%タンニン酸溶液を用いた導電染色処理を行った。処理後の試料はエタノール上昇系および t ブチルアルコールへと置換し凍結乾燥後にアルミニウム試料台に載台し、白金パラジウムコーティングによる帯電防止処置を実施して電解放出型走査電子顕微鏡観察に供した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>クリプトスポリジウム感染 SCID マウスモデルの腸管組織を用いて実施された過去の研究で、クリプトスポリジウムが小腸微絨毛間に嵌入する侵入形態や、複雑な形態の feeder organelle を形成することが示されている (Umemiya R, et al. J Parasitol. 2005;91(5):1034-9.; Rosales MJ, et al. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93(6):847-50.)。しかし feeder organelle をはじめとするクリプトスポリジウムに関連した微細構造の立体的特性については、不明な点が残されていた。</p> <p>本研究課題において実施したオスミウム浸軟試料の走査電顕観察により、クリプトスポリジウムに関連した細胞内微細構造の三次元的可視化が可能となった。これらの走査電顕所見は、同一個体から取得した樹脂包埋標本を用いた光顕及び透過電顕所見との対比的観察により裏付けられた。特に feeder organelle の形状について、透過電顕観察から 3つの異なる性状を有する部位が同定されたが、走査電顕観察により、上述の異なる3部位は連続性をもった構造であることが示された(現在論文投稿中)。これらの所見は動物個体におけるクリプトスポリジウム症発症メカニズムに関わる形態学的基盤の解明の一端に貢献できると考えられた。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>「研究成果の概要」欄で述べた通り、研究成果の一部に関する論文を投稿しており、現在はリバイスを行なっている。</p>

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 20 日

採択番号	30-共同-15		
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	菅沼 啓輔
研究課題名	抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と作用機序解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なかお よういち 中尾 洋一	早稲田大学理工学術院・教授 研究統括	
研究分担者	いとう しゅん 伊藤 駿	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士 2 年 活性化合物の精製・構造決定	
	たきぐち ありさ 滝口 ありさ	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士 2 年 活性化合物の精製・構造決定	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・助教 抗トリパノソーマ活性試験	
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>トリパノソーマ症は病状が進行すると死に至り得る深刻な感染症だが、既存薬は副作用が強いいため新たな治療薬の開発が望まれている。申請者は独自に採取・収集してきた海洋生物抽出物ライブラリーを所有しており、抗リーシュマニア活性を持つ新規化合物クリスタキセニン (Ishigami et al., <i>J. Org. Chem.</i>, 2012) など様々な新規天然化合物を単離、構造決定してきた。有望な天然化合物については将来的な創薬を目指し、合成研究も進めている (Fumiyama et al, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>, 2016 など)。</p> <p>先行研究において、貴センター菅沼啓輔助教が開発した試験管内トリパノソーマ培養系を用いてスクリーニングを実施した結果、強力な抗トリパノソーマ活性を示す抽出物サンプルを複数見出した。このうち山口県青海島産カイメンから活性を指標に精製を進めた結果、5α,8α-Epidioxyergosta-6,24(28)-dien-3β-ol (IC₅₀=41ng/mL) を同定している。</p> <p>そこで本研究では、新たなトリパノソーマ治療薬のリード化合物を得ることを目的とし、これまでに得たヒットサンプルから活性本体の更なる探索を行い、リード化合物候補を充実させる。さらに、リード化合物の標的タンパク質の同定を行って作用機序を解明し、新たな治療薬開発のための知見を集積させる。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>本研究では、<i>in vitro</i> アッセイにおける抗トリパノソーマ活性を指標にした活性化合物の単離・同定を継続して行った。加えて、研究代表者が保有する海洋生物抽出物ライブラリーに対して、大規模なスクリーニングを実施した。</p> <p>スクリーニングで抗トリパノソーマ活性が認められた海洋生物をメタノールで抽出した後、溶媒分画、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製を行った。得られた画分は 96 ウェルプレートで培養した <i>Trypanosoma congolense</i> に添加し、生細胞測定試薬を用いて抗トリパノソーマ活性を算出した。最終的に単離された活性化合物について、MS スペクトル、H-NMR、C-NMR、ならびに各種二次元 NMR スペクトル (COSY、NOESY、TOCSY、HMBC、HMQC など) を測定し、スペクトルデータを解析することで構造を同定した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>貴センター菅沼啓輔助教との共同研究により、研究代表者が保有する海洋生物抽出物ライブラリー 5622 サンプル (脂溶性画分及び水溶性画分各 2811 サンプル) に対して抗トリパノソーマ原虫活性スクリーニングを行った。同時にトリパノソーマ原虫に対する選択的活性を評価するために、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株およびマウス白血病細胞株 P388 に対する細胞毒性試験も行った。</p> <p>この結果、脂溶性画分 (サンプル濃度 0.25μg/ml) 90 サンプル、水溶性画分 (サンプル濃度 1.5625μg/ml) 35 サンプルに顕著な抗トリパノソーマ活性が認められ、このうち脂溶性画分 5 サンプルと水溶性画分 4 サンプルに高選択的な抗原虫活性を見出した。</p> <p>この結果を受けて現在活性本体の単離・同定を行っている。このうち屋久島新曾根産未同定海綿抽出物を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー及びシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーにより分画後、逆相 HPLC によって精製を行ったところ、新規化合物を含む 7 つの化合物の単離・同定に成功した。これらの化合物のうち 2 つの化合物において抗トリパノソーマ活性が認められ、その IC₅₀ 値は 1.17 および 1.61μg/mL であった。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>1.伊藤駿、万場昌子、菅沼啓輔、中尾洋一、 抗トリパノソーマ活性を有する海洋天然化合物の探索、 日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会、2018.06.13</p> <p>2.伊藤駿、万場昌子、菅沼啓輔、中尾洋一、 抗トリパノソーマ活性を有する海洋天然化合物、 第 13 回化学生態学研究会、2018.06.22</p>