

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和2年4月30日

採択番号	2019-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	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	
	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	2019年4月1日 ~ 2020年3月31日		
目的・趣旨	<p><i>Babesia bovis</i> によるウシのパ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「脳性パベシア症」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殆ど接着しない原虫株を樹立し、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。前年度は高接着株の <i>ves-1a</i> を過剰発現する原虫を各種作出し、その細胞接着性の変化を解析したが、組換え原虫株では予想された細胞接着性の上昇は見られなかった。そこで、今年度は、発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座をノックアウトすることで細胞接着性が失われるか解析を行い、その後、血管内皮細胞接着に関わる <i>ves-1a</i> 領域の決定を行い、原虫側のリガンド同定を行うとともに、血管内皮細胞側レセプターの同定に着手することを目的としている。</p>		
研究経過の概要	<p>昨年度の共同研究により推定された、発現している <i>ves-1</i> 遺伝子座の遺伝子破壊を試み、組換え原虫を得ることができたが、PCRにより遺伝子座の破壊までは確認できなかった。得られた組換え原虫を用い、ウシ脳毛細血管内皮細胞を用いた接着試験を行い、一部の株では接着性の低下がみられたが、接着性の低下がみられない株もあり、結論を下すには破壊を試みた遺伝子座の状況や <i>ves-1</i> の発現状況などさらなる解析が必要である。</p> <p>さらに、昨年度とは異なる <i>ves-1a</i> を過剰発現する原虫を作製し、血管内皮細胞高接着株で発現している <i>ves-1a</i> を安定して過発現する原虫を得た。本組換え原虫について、今後血管内皮細胞接着試験を行う予定である。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>・<i>ves-1</i> 遺伝子座破壊の試み</p> <p>次世代シーケンスによるゲノム・トランスクリプトーム解析により、第 2 染色体サブテロメア領域に存在する <i>ves-1</i> 遺伝子が発現していると推定された。そこで、当該遺伝子座に存在する <i>ves-1</i> α, β 配列を破壊するプラスミドコンストラクトを作製し、血管内皮細胞高接着株(C1, C3)、低接着株(C2, C5)に遺伝子導入を行った。薬剤選択の後それぞれの株について蛍光マーカートンパク質(GFP)を発現する株が得られた。得られた遺伝子導入株のクローニングを行い、遺伝子の破壊を PCR により確認しようとしたが、確認できなかった。遺伝子破壊領域が長く、遺伝子座に <i>ves</i>, <i>smorf</i>をはじめとする多数の多重遺伝子があることが原因と考えられる。そこで、得られたクローンを用い、血管内皮細胞への接着性を確認することとした。接着性試験を行った結果、高接着株由来のそれぞれ 2 クローンでは、C1 由来の C1-B6 は接着性低下、C1-B8 は接着性上昇、C3 由来の C3-E4, C3-C7 は接着性低下と、3 クローンは予想通り接着性の低下がみられたが、1 クローンでは逆に接着性上昇がみられた。一方、低接着株由来のクローンでは、概ね接着性は低いままであったが、C5 由来の C5-F11 クローンでは若干接着性の上昇がみられた。今後遺伝子座の破壊状況、遺伝子導入後の <i>ves-1</i> の発現状況の精査が必要である。</p> <p>・<i>ves-1</i> 遺伝子過剰発現原虫の作製</p> <p>昨年度は主にエピソーム上で <i>ves-1</i> (α ないし β) を過発現させる実験を行ったが、<i>ves-1</i> の過発現が安定しない、<i>ves-1</i> に蛍光マーカートンパク質を融合させて発現させたが、蛍光マーカートンパク質自体が <i>ves-1</i> の赤血球側輸送や細胞接着性に影響を与えている可能性が否定できなかった。そこで、本年度は <i>myc</i> 配列を融合した <i>ves-1</i> α 遺伝子を <i>ef-1</i> α 遺伝子座に挿入する形で、<i>ves-1</i> α 過剰発現原虫の作製を試みた。その結果、血管内皮細胞低接着株 C2 株に高接着株 C3 の <i>ves-1</i> α を過発現させた原虫株が得られた。<i>ef-1</i> α 遺伝子座への発現コンストラクトの挿入は PCR によって確認され、<i>ves-1</i> α の過発現は抗 <i>myc</i> 抗体を使用した間接蛍光抗体法、ウェスタンブロット法にて確認された。得られた株をクローニング後も安定して <i>ves-1</i> α の過発現が観察されているため、今後本原虫について血管内皮細胞接着試験を行う予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>該当なし。</p>