

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022年5月30日

|         |  |                          |       |
|---------|--|--------------------------|-------|
| 採択番号    | 2021-共同-9  |                          |       |
| 研究部門    | 国際連携研究部門   | 原虫病研究センター<br>内共同研究担当教員   | 麻田 正仁 |
| 研究課題名   | 非固有宿主馴化バベシア原虫を用いた宿主域決定因子の同定  |                          |       |
| 研究代表者   | (ふりがな)<br>氏 名  | 所属部局等・職名                 |       |
|         | やまぎしじゅんや<br>山岸 潤也  | 北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授 |       |
| 研究分担者   |  |                          |       |
|         |  |                          |       |
|         |  |                          |       |
|         | あさだ まさひと<br>麻田 正仁  | 帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授      |       |
| 研究期間    | 2021年4月1日 ~ 2022年3月31日   |                          |       |
| 目的・趣旨   | <p>一般にバベシア原虫の宿主特異性は高いが、人為的な変異導入により <i>B. bovis</i> がヒト赤血球に馴化することも知られており(私信)、その再現性について我々も確認している。そこで本研究では、バベシア原虫の宿主特異性を規定する分子メカニズムの一端を明らかにする目的で、我々が再取得したヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> の比較ゲノム、トランスクリプトーム解析を行う。一方、<i>B. microti</i> は、げっ歯類を宿主とするが、同時にヒトへの感染性と病原性も有する。ここで、ヒトにおける感染性と病原性を規定する分子メカニズムの解明は疾病対策を行う上で重要であるが、ヒト赤血球を用いた <i>in vitro</i> 培養系がないことが妨げになっている。そこで、ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> 作出と同様の方法を用いて、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出を試みる。</p>  |                          |       |
| 研究経過の概要 | <p>昨年度の原虫病研究センター共同研究において、4株の独立したヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> の取得に成功し、そのゲノム解析を行ったが、4株に共通する変異は見いだせなかった。その際、変異元の親株ゲノムを参照にした re-sequencing ではなく、既知 T2Bo 株ゲノム配列を参照に解析を行ったことから、構造変化を検出できなかった可能性が考えられたため、本研究では、親株と馴化株の <i>de novo</i> ゲノム解析を行った。さらに、転写変化が馴化に関与する可能性を考え、4株の馴化株と、親株、および、親株をクローン化する際に得られた兄弟株3株間で RNA-seq 解析も行った。</p> <p>ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出については、SCID マウスの赤血球をヒト赤血球に置換した SCID-HuRBC マウスを作製し、<i>B. microti</i> を接種した。<i>B. microti</i> 接種後、原虫感染率が上昇したところで、血液塗抹標本を作製し、間接蛍光抗体法にて、ヒト赤血球への感染を解析した。</p> |                          |       |

|                      |   |
|----------------------|---|
| <p>研究成果の<br/>概 要</p> | <p>RNAseq の結果、全 3781 遺伝子中、93 遺伝子が 8 倍以上かつ補正後 p 値が 0.05 以下を満たす発現変化を示した。同様に、693 遺伝子が 2 倍以上の発現変化を示した。このうち、馴化に関与する可能性のある遺伝子として、下記の遺伝子を抽出した (Table 1)。特に、SmORF、および、merozoite surface antigen 2a2 が馴化に関与する可能性が高いと考えられる。</p> <p>加えて、<i>B. bovis</i> には 10 回以上の膜貫通領域を持つ遺伝子として multi-transmembrane (mtm) type A (16 遺伝子) および、mtm type B (10 遺伝子) が知られているが、type A のうち 3 遺伝子、type B のうち 9 遺伝子が 2 倍以上の発現変動を示した (Table 2)。mtm は栄養素等の化合物の膜を介した輸送に関与していると考えられており、blasticidin 耐性に関与することも知られていることから、これらがのヒト赤血球への馴化に関与する可能性も十分考えられる。</p> <p>VESA 遺伝子については、標準ゲノム (T2Bo) を参照配列とした発現解析で、BBOV_IV005660 (ves1-alpha)、BBOV_IV002830 (ves1-beta) の発現更新が認められたが (Table 1)、VESA 領域は高頻度で組換えが発生するとされており、標準ゲノム (T2Bo) を参照配列に用いることは適切ではない。そこで、4 株の馴化株のうちの 1 つ (6H 株) を de novo sequencing し、改めて RNA-seq 解析を行ったところ、chr2:2578 Kb 領域で ves1-alpha、および、ves1-beta が対で高発現していることが判明したが、親株に対しての発現比に顕著な違いは認められなかった (Figure 1)。</p> <p>今後、上記候補遺伝子を過剰発現する組換え原虫の作出を行うことで、馴化に関わる遺伝子の特定を進めたいが、親株がヒト赤血球で増殖できない理由が、1) 侵入にあるのか、2) 赤血球内での複製にあるのか、それとも、3) egress 時なのかを改めて確認することで、対象遺伝子の優先順位に反映させる必要がある。</p> <p>ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出については、SCID マウスの脾臓を摘出後ヒト赤血球を隔日で接種し、マウス赤血球の大半をヒト赤血球に置換した SCID-HuRBC マウスを作製した。同時に <i>B. microti</i> 感染マウスを用意し、マウスから採血後、N-ニトロソ-N-エチル尿素 (NEU) 2 mM 存在下で 8 時間培養し、変異を誘導した。変異を誘導した原虫ならびに NEU 未処理原虫をそれぞれ 2 頭の SCID-HuRBC マウスに接種し、感染率をモニタリングした。感染率は NEU 処理原虫接種群が NEU 未処理原虫接種群に比べて高く推移し、実験開始 11 日目に原虫感染率が十分あがったところで血液塗抹標本作製し、マウス赤血球に対する間接蛍光抗体法を実施した。すると、赤血球の大半がマウス赤血球に戻っており、ヒト赤血球に感染している原虫は発見されず、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出には至らなかった。本実験から NEU 処理による原虫の赤血球感染効率向上が示唆されたが、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出には、SCID-HuRBC マウスへの追加のヒト赤血球投与も含め、更なる条件の最適化が必要であると考えられた。</p> |
| <p>研究成果の<br/>発 表</p> | <p>特記事項なし。</p>  |

| <b>Table 1</b>  |          |         |          |  |
|---|----------|---------|----------|--|
| gene ID   | baseMean | Log2 FC | padj     | annotation   |
| BBOV_IV005660   | 2491.1   | 7.0     | 3.3E-288 | variant erythrocyte surface antigen-1, alpha subunit |
| BBOV_IV003790   | 17.1     | 6.3     | 3.26E-08 | ATP binding family protein                           |
| BBOV_III000050  | 4411.5   | 6.1     | NA       | SmORF  |
| BBOV_IV002830   | 1031.4   | 5.6     | 0.003809 | variant erythrocyte surface antigen-1, beta subunit  |
| BBOV_IV003840   | 9.7      | 5.5     | 5.88E-06 | ATP binding family protein, putative                 |
| BBOV_III006480  | 8.6      | 5.3     | 3.35E-05 | Spherical Body Protein 2 truncated copy 8            |
| BBOV_III006230  | 8.5      | 5.3     | 2.09E-05 | uracil-DNA glycosylase family protein                |
| BBOV_III006220  | 1.1      | -4.8    | 0.103083 | RNA recognition motif domain containing protein      |
| BBOV_III006330  | 59.5     | 4.2     | 5.27E-16 | YT521-B-like family protein                          |
| BBOV_VI000020   | 88.3     | 3.9     | 1.02E-10 | cytochrome c oxidase subunit III                     |
| BBOV_I005060  | 24.2     | 3.7     | 2.24E-06 | ubiquitin conjugating enzyme, putative               |
| BBOV_I003000  | 119.1    | 3.7     | 7.61E-25 | merozoite surface antigen-2a2                        |
| additional ves and SmORF, mtm, and hypothesis protein have been omitted |          |         |          |  |

| <b>Table 2</b> |          |         |          |            |
|----------------|----------|---------|----------|------------|
| gene ID        | baseMean | Log2 FC | padj     | annotation |
| BBOV_IV012100  | 8.9      | -7.1    | 3.58E-08 | mtmB       |
| BBOV_IV012090  | 0.9      | -4.6    | 0.137791 | mtmB       |
| BBOV_IV000100  | 84.7     | 3.6     | 1.75E-20 | mtmB       |
| BBOV_II000070  | 59.5     | 3.0     | 1.84E-13 | mtmB       |
| BBOV_II007760  | 44.1     | 2.5     | 0.000433 | mtmB       |
| BBOV_II007770  | 356.4    | 1.9     | 1.22E-22 | mtmB       |
| BBOV_I001380   | 0.1      | -1.7    | 0.672433 | mtmB       |
| BBOV_IV000110  | 520.1    | 1.7     | 8.19E-16 | mtmB       |
| BBOV_III011920 | 1973.0   | 1.7     | 0.020318 | mtmB       |
| BBOV_III000060 | 10087.1  | -0.5    | 3.49E-07 | mtmB       |
| BBOV_I001310   | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_II000020  | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_II007800  | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_II007840  | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_III001210 | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_III001290 | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_III002360 | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_III011980 | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_IV000210  | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_IV000340  | 0.0      | NA      | NA       | mtmA       |
| BBOV_IV012120  | 52.8     | 5.0     | NA       | mtmA       |
| BBOV_II004200  | 0.2      | -3.2    | 0.4222   | mtmA       |
| BBOV_IV005630  | 140.7    | 2.3     | NA       | mtmA       |
| BBOV_I001200   | 232.9    | 2.1     | 0.009274 | mtmA       |
| BBOV_III000010 | 3875.3   | -1.4    | NA       | mtmA       |
| BBOV_IV000020  | 123.3    | 0.2     | 0.896661 | mtmA       |

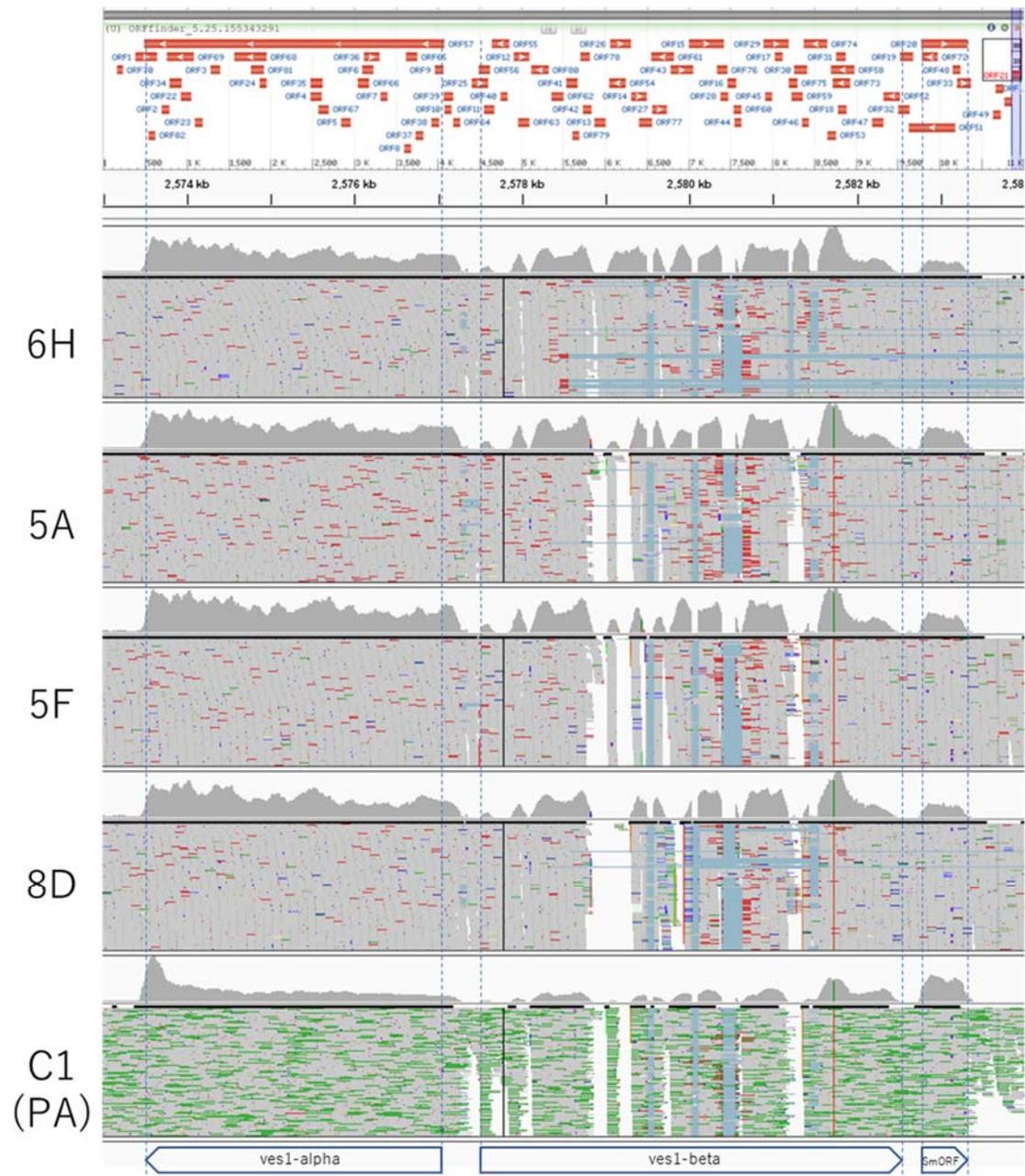


Figure 1