

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

2022 年 6 月 10 日

採択番号	2021・共同-1		
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	介卵伝播性時における共生菌—マダニ間のクロストーク解析		
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	
	たや ゆりえ 田谷 友里恵	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	おおまえ はるき 大前 日希	北海道大学獣医学部・学部学生	
	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・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マダニは多様な微生物を保有することが知られている。一部の微生物は共生体としてマダニの生理活動にとって重要な役割を持つことが認知されつつある。国内に分布するマダニにおいても、マダニ集団内で広く維持されているコア共生微生物の存在が明らかになり、その役割解明が待たれる。本共同研究では、コア共生微生物の中でも <i>Spiroplasma</i> を研究対象に、マダニ集団内での維持・伝播メカニズムの解明を目的とした。特に、これまでの研究により示唆された、マダニ体内での垂直および水平伝播の可能性について、帯広畜産大学原虫病研究センターのバイオリソースを活用し、検証した。		
研究経過の概要	研究代表者らが過去に分離した、2 種類の <i>Spiroplasma</i> 分離株を実験に用いた。 <i>Spiroplasma ixodetis</i> (strain 135) は、 <i>Ixodes monospinosus</i> からシカダニ細胞 (ISE6) を用いて分離したもので、同細胞を用いて培養し、精製菌体を得た。 <i>Spiroplasma mirum</i> (strain Q35) は、 <i>Ixodes pavlovsky</i> から ISE6 細胞を用いて分離し、SP4 無細胞培地を用いて菌体の培養を行い、精製菌体を得た。接種実験には、PBS 接種群、抗生物質 (ペニシリン) 接種群、 <i>S. ixodetis</i> 接種群 (4 群: 低・高濃度菌体 +/- 抗生物質)、 <i>S. mirum</i> 接種群 (4 群: 低・高濃度菌体 +/- 抗生物質添加) の合計 10 群の比較群を準備した。各群 25 個体のフタトゲチマダニ (原虫研累代飼育株) 成ダニに対し、マイクロインジェクションにより接種実験を行った。接種後マダニは、1 週間飼育した後ウサギへの吸血試験に供し、産卵期まで飼育して採卵した。 <i>Spiroplasma</i> の伝播確認は、特異的 PCR を用いて実施した。加えて、 <i>S. ixodetis</i> の自然感染が認められる <i>Ixodes ovatus</i> を野外採集し、吸血試験に用いた。		

研究成果の概要	【<i>Spiroplasma</i> 接種によるマダニへの影響】 2 種の <i>Spiroplasma</i> を接種したフタトゲチマダニの産卵率(卵重量/飽血体重)および幼ダニ孵化率を算出した。PBS コントロール群と比較して、全ての接種群で有意な産卵率および孵化率の低下は認められなかった(表1)。 【<i>Spiroplasma</i> の卵および幼ダニへの伝播解析】 各飽血マダニが産卵した卵および孵化幼ダニを 10 個体プールして DNA を抽出し、PCR により <i>Spiroplasma</i> の検出を試みた。その結果、<i>S. ixodetis</i> を高濃度 (5×10^{11} 菌体/個体) で接種した群の一部の個体で、卵および幼ダニから <i>Spiroplasma</i> が検出された(表1)。 表1. <i>Spiroplasma</i> 接種フタトゲマダニにおける吸血試験の結果 <table><tr><th>接種群</th><th>平均卵重量/飽血体重</th><th>平均孵化率</th><th><i>Spiroplasma</i> 陽性卵</th><th><i>Spiroplasma</i> 陽性幼ダニ</th></tr><tr><td>PBS</td><td>45.1</td><td>84.8</td><td>0/6</td><td>0/6</td></tr><tr><td>PBS + penicillin</td><td>44.9</td><td>76.4</td><td>0/7</td><td>0/7</td></tr><tr><td><i>S. mirum</i> (低濃度)</td><td>51.1</td><td>82.4</td><td>0/7</td><td>0/7</td></tr><tr><td><i>S. mirum</i> (高濃度)</td><td>49.2</td><td>76.7</td><td>0/7</td><td>0/7</td></tr><tr><td><i>S. mirum</i> (低濃度) + penicillin</td><td>50.3</td><td>66.1</td><td>0/6</td><td>0/6</td></tr><tr><td><i>S. mirum</i> (高濃度) + penicillin</td><td>39.3</td><td>61.8</td><td>0/7</td><td>0/7</td></tr><tr><td><i>S. ixodetis</i> (低濃度)</td><td>45.9</td><td>81.7</td><td>0/7</td><td>0/7</td></tr><tr><td><i>S. ixodetis</i> (高濃度)</td><td>38.3</td><td>71.7</td><td>2/7</td><td>2/7</td></tr><tr><td><i>S. ixodetis</i> (低濃度) + penicillin</td><td>46.6</td><td>80.4</td><td>0/6</td><td>0/6</td></tr><tr><td><i>S. ixodetis</i> (高濃度) + penicillin</td><td>46.9</td><td>86.5</td><td>1/3</td><td>1/3</td></tr></table> 【<i>I. ovatus</i> における <i>Spiroplasma</i> 伝播解析】 過去の研究で高率に <i>S. ixodetis</i> を保有することが知られている <i>I. ovatus</i> を実験的に吸血試験に供し、卵からの <i>Spiroplasma</i> 検出を試みた。その結果、ほぼ 100% の個体で <i>Spiroplasma</i> の伝播が確認された。 【まとめと考察】 これまでマダニが保有する <i>Spiroplasma</i> がどのように集団内で伝播・維持されているかを調べた報告はない。本共同研究により、<i>Spiroplasma</i> を高率に保有する <i>I. ovatus</i> においては、高確率で垂直伝播が起こることが初めて実験的に証明された。また、<i>S. ixodetis</i> においては、低率ながらフタトゲチマダニへ水平的に伝播しうることが確認された。 我々の過去の研究において、国内のマダニが保有する <i>Spiroplasma</i> の遺伝子型を調べたところ、ほとんどの遺伝子型は宿主マダニ種との相関が高く、垂直伝播によって維持されていることが示唆された。一方で、同一の <i>Spiroplasma</i> 遺伝子型が異なるマダニ種間で検出される事例もあり、その要因については不明であった。本共同研究により、<i>Spiroplasma</i> の水平伝播の可能性が示されたことから、自然界における伝播メカニズム解明への糸口となること期待できる。 <i>Spiroplasma</i> は、一部の節足動物において病原体制御の役割を持つこと等が知られており、本研究成果を基盤にマダニにおけるその機能解析を進めたい。	接種群	平均卵重量/飽血体重	平均孵化率	<i>Spiroplasma</i> 陽性卵	<i>Spiroplasma</i> 陽性幼ダニ	PBS	45.1	84.8	0/6	0/6	PBS + penicillin	44.9	76.4	0/7	0/7	<i>S. mirum</i> (低濃度)	51.1	82.4	0/7	0/7	<i>S. mirum</i> (高濃度)	49.2	76.7	0/7	0/7	<i>S. mirum</i> (低濃度) + penicillin	50.3	66.1	0/6	0/6	<i>S. mirum</i> (高濃度) + penicillin	39.3	61.8	0/7	0/7	<i>S. ixodetis</i> (低濃度)	45.9	81.7	0/7	0/7	<i>S. ixodetis</i> (高濃度)	38.3	71.7	2/7	2/7	<i>S. ixodetis</i> (低濃度) + penicillin	46.6	80.4	0/6	0/6	<i>S. ixodetis</i> (高濃度) + penicillin	46.9	86.5	1/3	1/3
	接種群	平均卵重量/飽血体重	平均孵化率	<i>Spiroplasma</i> 陽性卵	<i>Spiroplasma</i> 陽性幼ダニ																																																			
	PBS	45.1	84.8	0/6	0/6																																																			
	PBS + penicillin	44.9	76.4	0/7	0/7																																																			
	<i>S. mirum</i> (低濃度)	51.1	82.4	0/7	0/7																																																			
	<i>S. mirum</i> (高濃度)	49.2	76.7	0/7	0/7																																																			
	<i>S. mirum</i> (低濃度) + penicillin	50.3	66.1	0/6	0/6																																																			
	<i>S. mirum</i> (高濃度) + penicillin	39.3	61.8	0/7	0/7																																																			
	<i>S. ixodetis</i> (低濃度)	45.9	81.7	0/7	0/7																																																			
	<i>S. ixodetis</i> (高濃度)	38.3	71.7	2/7	2/7																																																			
<i>S. ixodetis</i> (低濃度) + penicillin	46.6	80.4	0/6	0/6																																																				
<i>S. ixodetis</i> (高濃度) + penicillin	46.9	86.5	1/3	1/3																																																				
研究成果の発表	北海道大学大学院国際感染症学院学位論文 小方昌平 Studies on genetic diversity and transmission dynamics of <i>Spiroplasma</i> in ixodid ticks (マダニにおける <i>Spiroplasma</i> の遺伝的多様性と伝播動態に関する研究)																																																							

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 23 日

採択番号	2021-共同-2		
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	西川 義文
研究課題名	トキソプラズマ分泌性タンパク質群の宿主ミトコンドリアとの相互作用解析		
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	福岡大学 理学部化学科・教授	
研究分担者	にしごり みつひろ 錦織 充広	福岡大学 理学部化学科・助教	
	にし しょうへい 西 翔平	福岡大学 大学院理学研究科・大学院生	
	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	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	細胞内におけるエネルギーの産生場であるミトコンドリアは、真核生物の代謝系や品質管理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奇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が着目されている。これまで代表者は、ミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫について一貫した研究を進め、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 (<i>Sci. Signal.</i> 2009, 2011; <i>PNAS</i> 2013; <i>Nat. Commun.</i> 2014, 2019, 2020; <i>Sci. Rep.</i> 2017; <i>iScience</i> 2019, 2020; <i>JBC</i> 2020)。 本研究の目的は、トキソプラズマ原虫に感染した宿主内でのミトコンドリアがどのような影響を受け、またその際のタンパク質を通じた新たな相互作用に関しての学術的知見を得ることにあり、これまでに行ってきた抗ウイルス自然免疫研究との共通点や相違点を発掘することにある。そこで本研究期間では、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のミトコンドリアへの局在に関する生化学的及び細胞生物学的な解析を主に行った。		

研究経過の概要	海外の研究チームによる研究結果では、タイプ I 型のトキソプラズマに感染した細胞内において一部の宿主ミトコンドリアがタキゾイド周辺に集まり、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ている (PLoS Biol. 2014)。その生理的な意義を解明するために、本研究では以下のような実験を行った。 1) 西川研究室にて作製されたトキソプラズマゲノムの相補遺伝子 (GRA ファミリー) をクローニングした発現ライブラリー (FLAG タグ付加) を哺乳動物細胞 (HeLa) に遺伝子導入し、それら発現細胞内のミトコンドリア形態を免疫染色法 (抗 COX IV) にて観察した。 2) 上記、プラスミドを哺乳動物細胞 (HEK293) にもトランスフェクションし、発現細胞よりミトコンドリア分画を行い、ミトコンドリア画分をウェスタンブロット法 (抗 FLAG) により解析した。 3) 上記の実験により、ミトコンドリアへの局在が示された GRA タンパク質の安定発現株 (HEK293) を樹立した。その際にはタグとして、Myc タグを用いた。 4) 樹立した安定発現株を用いて、免疫沈降実験を行い、GRA タンパク質と相互作用する因子を網羅的に探索した。
研究成果の概要	西川研究室にて作製された計 17 種類の GRA 遺伝子 (FLAG タグ付加) を HeLa 細胞に導入し、免疫染色法により、発現した各 GRA タンパク質の細胞内局在解析を行った。その結果、GRA8 及び GRA25 において綺麗なミトコンドリアへの局在が確認できた。 次に、GRA8 及び GRA25 の発現プラスミドをそれぞれ HEK293 細胞へトランスフェクションし、その後細胞からミトコンドリア分画を行い、得られたミトコンドリア画分をウェスタンブロット法 (抗 FLAG) により解析した。その結果、GRA25 においては非常に高い割合でミトコンドリア画分に局在していることが明らかになった一方で、GRA8 は発現量がそれほど多くはなく検出されたタンパク質も比較的その多くが細胞質中に存在していた。以上の結果から、トキソプラズマの GRA25 は宿主内ミトコンドリアと高い親和性を示すことが示唆された。そこで、GRA25 の詳細なミトコンドリア局在様式を調べるために、このタンパク質に Myc を付加した組換え体の安定発現株を HEK293 細胞にて樹立した。樹立した安定発現株は、GRA25 を発現している以外は特に大きな細胞への影響は見られずに、成長速度もコントロール細胞と大差はなかった。次に、この安定発現株を用いて GRA25 と相互作用する宿主細胞内タンパク質を調べた。実験方法としては、免疫沈降法を用いて行い、細胞抽出液に抗 Myc 抗体を添加し、Protein G アガロース樹脂にて共免疫沈降を確認した。その結果、複数のミトコンドリア外膜タンパク質が沈殿していることがプロテオーム解析により明らかになった。現在は、GRA25 を欠損した組換え原虫を作製中であり、今後はその表現型解析も含めて研究を進める予定である。
研究成果の発表	該当年度は、特になし。

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 27 日

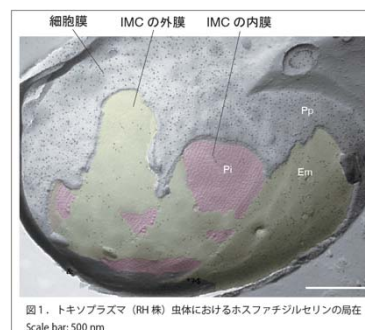
採択番号	2021-共同-3		
研究部門	先端予防治療学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津 信一郎
研究課題名	可視化マラリア原虫を用いたオルガネラの三次元構造解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	あらき たまさ 荒木 球沙	国立感染症研究所 寄生動物部・任期付研究員	
研究分担者	あんのうら たけし 案浦 健	国立感染症研究所 寄生動物部・室長	
	かわい さとる 川合 寛	獨協医科大学 熱帯病寄生虫病学・教授	
	かくた そういちろう 角田 宗一郎	順天堂大学 形態解析イメージング研究室・准教授	
	かわず しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マラリア原虫は、非常に高度な生活環・増殖制御機構を持つユニークな単細胞の真核生物である。本研究では、そのマラリア原虫の肝内型ステージの増殖期と休眠期における内部オルガネラ分配のメカニズムを明らかにすることを目的に、集束イオンビーム内蔵の走査型電子顕微鏡(FIB-SEM)を使用し、可視化肝内型マラリア原虫のオルガネラ三次元構造解析を試みる。使用するマラリア原虫は、申請者らが既に作製に成功した可視化サルマラリア原虫 <i>Plasmodium cynomolgi</i> (Pcy-GFP)と可視化ネズミマラリア原虫 <i>P.berghei</i> (Pb-mChe)株を使用し、培養肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 感染実験系により調整したサンプルで各種解析を行う。		
研究経過の概要	予定していた河津博士との帯広畜産大学での共同研究の打合わせは、新型コロナウイルス蔓延に伴い、オンライン会議にて滞りなく行った(2022 年 2 月)。研究に関しては、おおむね研究計画通りに解析が進み、Pb-mChe の肝内型ステージにおける増殖期の内部オルガネラ構造の三次元構造解析が完了し、今後は、感染早期の原虫等のオルガネラ構造を同様の解析で明らかにし、増殖期におけるオルガネラの発達・増殖機構の網羅的な観察を行う予定である。また、Pcy-GFP 感染実験に関してもおおむね計画通りに研究は進み、Pcy-GFP 感染ハマダラカからスポロゾイトを作製することに成功し、このスポロゾイトを用いてサルマラリア原虫の肝内型ステージにおける増殖期・休眠期の作製(<i>in vitro</i>)が完了した。現在、これら原虫は、FIB-SEM 解析に進み、内部オルガネラ構造の解析を行っている。		

研究成果の概要	1. 可視化ネズミマラリア原虫 Pb-mChe の FIB-SEM 解析 <i>mCherry</i> 発現可視化ネズミマラリア原虫 Pb-mChe 株をマウスに感染させ、感染血をハマダラカへ吸血・感染させ唾液腺を回収し、スポロゾイト(SPZ)を大量に得ることが出来た。回収した SPZ は、培養肝細胞 Huh7 へ感染させ、野生型の増殖期にあたる 48 時間後(多核体の原虫が個々に分裂する直前)に固定し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて <i>mCherry</i> シグナルから原虫の位置の特定を行った。その後、サンプルは電子顕微鏡を用いて観察し、両顕微鏡により得られた像の相関を得る解析手法 CLEM 法 (Correlative light and electron microscopy) を用いて FIB-SEM 解析を行った。得られた複数枚の切片データから、原虫の内部オルガネラ構造の 3D 化がほぼ終わり、増殖時における原虫オルガネラのネットワーク形成の一部を把握することが出来た【図 1】。 2. 可視化サルマラリア原虫 Pcy-GFP の FIB-SEM 解析 Pb-mChe 同様に、Pcy-GFP 株をアカゲザルに感染させ、得られた SPZ を培養肝細胞へ感染させ、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて GFP シグナルから原虫の位置の特定を行った。観察の結果から、GFP のシグナルが大きく多核形成が認められた原虫(増殖期)と GFP のシグナルが小さい原虫(休眠期)を確認することが出来た【図 2】。現在、これら原虫は電子顕微鏡を用いて観察し、CLEM 法を用いた FIB-SEM 解析中である。 【図 1】 Pb-mChe 肝内型(増殖期)を用いた内部オルガネラ構造解析 CLEM法 (Correlative Light and Electron Microscopy) 同一試料を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて観察し、両顕微鏡により得られた像の相関を得る解析手法 1-200 slices/840 slices 【図 2】 Pcy-GFP 肝内型(増殖期・休眠期)の観察 GFP発現サルマラリア原虫 (Pcy-GFP) 感染 8 日後の培養肝細胞: <i>in vitro</i>
研究成果の発表	学会発表 ○荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「FIB-SEM 解析を用いたマラリア原虫内部オルガネラ構造の解明」第 44 回日本分子生物学会(横浜:2021 年 12 月) ○荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡 3D 構造解析を用いたマラリア原虫のオルガネラ分配機構の解明」第 5 回日本共生生物学会(JAMSTEC・オンライン:2021 年 11 月) ○荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡三次元構造解析を用いたマラリア原虫内部オルガネラ構造の解明」第 80 回日本寄生虫学会東日本支部会(獨協大・オンライン:2021 年 10 月) ○荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、小林宏尚、中野由美子、久枝一、案浦健「電子顕微鏡 3D 構造解析を用いたマラリア原虫のオーシスト期・核分裂様式の解明」第 90 回日本寄生虫学会(奈良・オンライン:2021 年 4 月) 受賞 第 5 回日本共生生物学会 若手優秀発表賞 (JAMSTEC:2021 年 11 月)

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 31 日

採択番号	2021-共同-4		
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	トキソプラズマにおけるオートファゴソームの微細構造と構成膜脂質の ナノスケールレベルでの分布解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふじた あきかず 藤田 秋一	鹿児島大学 共同獣医学部・教授	
研究分担者	またたに たつり 正谷 達膳	岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 人獣共通感染症学 研究室・准教授	
	げん がくなん 玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	酵母の遺伝的解析研究によって動物細胞でもオートファジー制御機構の詳細が明らかにされてきた。最近、同じ真核生物であるトキソプラズマについても、ミトコンドリア維持あるいは細胞分裂にオートファジーの関与が示唆されているが、哺乳類細胞など一般生物との違いが多く、その詳細は不明である。本研究では、申請者らが開発した急速凍結・凍結割断レプリカ法および免疫電子顕微鏡技術を駆使し、トキソプラズマのオートファゴソームの微細構造およびそれを形成する脂質膜を破壊すること無く可視化し、さらに構成する脂質成分の特定を行う。その成果に基づき、原虫におけるオートファジーの機能解明を目指す。		
研究経過の概要	申請者らは、急速凍結・凍結割断レプリカ標識(QF-FRL)法によってグリセロリン脂質の一つであるホスファチジルセリン(PtdSer)の局在を検討し、感染力の強い <i>Toxoplasma gondii</i> の RH 株と感染力の低い PLK 株細胞膜で違いのあることを明らかにした(図 1 の金コロイド)。本研究では、単離精製した <i>T. gondii</i> を飢餓状態あるいは薬物処理によりオートファジー誘導時での PtdIns(3)P の微細分布の解析を行なった。しかしながら、酵母あるいは哺乳類培養細胞で観察された様な二重膜構造をしたオートファゴソームの形成は明確にできなかった。今後はさらに条件検討をすることによりオートファゴソームでの PtdIns(3)P の局在を検討する予定にしている。		



研究成果の 概 要	我々は脂質の超微局在を明らかにすることが、膜脂質の機能を解明するために必須であると考え、そのための方法開発に注力してきた。その結果、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法 (QF-FRL: Quick Freezing & Freeze-fracture Labeling) によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示した。本研究では、この QF-FRL 法を用いることにより、<i>T. gondii</i> においてグリセロリン脂質の一つであるホスファチジルセリン (PtdSer) の微細分布を明らかにした (図1)。 <i>T. gondii</i> において RH 株および PLK 株ともに、PtdSer は細胞膜、inner membrane complex (IMC) 膜の外膜の内葉、外葉ともに存在が確認できたが、いずれの膜においても内葉の方がその密度は高いものであった。しかしながら、IMC の内膜では、PtdSer は外葉には局在するものの、内葉には存在しなかった。RH 株と PLK 株を比較した場合、いずれの膜においても内葉に局在する PtdSer の密度に差は見られなかったものの、外葉では RH 株の方が PLK 株よりも有意に高いものであった。RH 株と PLK 株の宿主細胞への感染性を比べた場合、RH 株の方が高いことが報告されている。このことから、<i>T. gondii</i> の生体膜の PtdSer の発現量がその感染力に影響していることが示唆された。さらに、<i>T. gondii</i> では PtdSer が IMC 膜の内膜では内葉に存在しないことから、IMC の内膜と外膜との間に PtdSer の拡散を妨げる何らかの障壁が存在することが示唆された。 また本研究では、単離精製した <i>T. gondii</i> の細胞内における PI(3)P の微細分布を可視化することに成功した (図 2)。しかしながら、飢餓状態あるいは薬物処理によりオートファジー誘導を行なった <i>T. gondii</i> においても、酵母あるいは哺乳類培養細胞で観察された様な二重膜構造をしたオートファゴソームの形成は明確に観察することはできなかった。今後はオートファジー誘導を行う条件検討を行い、オートファゴソーム様構造の観察をできるよう予定しており、同時に PI(3)P の微細分布の解析を行う。 PtdIns(3)P が局在するベジクル 図 2. トキソプラズマ虫体の細胞内での PtdIns(3)P の局在 (電顕写真)
研究成果の 発 表	1. 小西里可子、向達汐美、福田佳代子、正谷達膳、藤田秋一、免疫電顕法を用いたヒト細胞感染トキソプラズマ生体膜におけるホスファチジルセリンの微細局在. 第 95 回 日本生化学大会、名古屋、2022 年 11 月 9 日 (予定).

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 6 日

採択番号	2021-共同-5		
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	西川 義文
研究課題名	ポピュレーショントラックによる マウスでの潜伏感染に必要なトキソプラズマ原虫遺伝子の機能評価		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	すぎ たつき 杉 達紀	北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所・助教	
研究分担者			
	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	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	トキソプラズマ原虫の潜伏感染は永続的なものではなく、宿主による原虫の排除が生じていることが近年報告されている。潜伏感染の維持を左右する原虫側因子を同定し作用機序を解明することは、潜伏感染の排除速度に介入して潜伏感染を制御する手法につながる。一方、トキソプラズマの感染実験において潜伏感染成立・維持の最終的な評価軸である脳内シスト数はマウス個体間で振れ幅が大きく、潜伏感染成立に影響する原虫因子の解析を妨げている。我々は解析対象遺伝子に変異を持った原虫と野生型原虫の増殖性の差異を同一マウス体内で評価することにより遺伝子機能を評価する手法の確立を目指した。		
研究経過の概要	<u>①迅速な遺伝子変異原虫ポピュレーション調整手法の確立</u> CRISPR/Cas9 を用いて変異導入された原虫集団を低継代数で樹立する系の確立を試みた。トキソプラズマ原虫において十分な効率で変異導入を実現する donor oligo の条件検討を実施した。トランスフェクション後にゲノム編集がされた原虫を薬剤選択し、変異株ポピュレーションが十分に濃縮できる期間の検討を実施した。 <u>②NGS によるポピュレーション追跡手法の確立</u> 次世代シーケンサー(NGS)を用いて、変異株と野生株などの混合集団におけるポピュレーションを推定する手法の確立を試みた。解析モデルとして TgGP 遺伝子にサイレント変異株もしくは KO 変異を導入した 2 株の混合集団の <i>in vitro</i> 培養のサンプルを利用した。継代のたびにゲノム DNA を精製し、変異 SNP 導入箇所を増幅し NGS 解析により KO 変異の割合を解析した。		

研究成果の 概 要	<u>①迅速な遺伝子変異原虫ポピュレーション調整手法の確立</u> ゲノム編集をするトキソプラズマ原虫の親株として潜伏感染実験系が確立している <i>Pru Δku80Δhxgprt</i> 株を導入し(Dr. David Bzik より許可を得て帯広畜産大学西川教授より分与を受けた)、一つのプラスミドに Cas9:gRNA:選択マーカ―を搭載した組換えコンストラクトおよび種々の長さの単鎖 DNA ドナーと組み合わせて電気穿孔法で原虫へ導入した。Cas9 が切断する部位の周囲 100bp のドナーを用いることで、遺伝子導入後の薬剤選択 1～2 週間で 9 割を超えた原虫に変異が導入されていることを確認した。樹立した系を用いてアミロペクチン代謝に関わる 6 遺伝子(TgGP/ TgGWD/ TgPPDK/ Amy1/ Amy2/ D-enzyme)の全てについて KO 変異を導入することに成功した。 <u>②NGS によるポピュレーション追跡手法の確立</u> TgGP の KO 変異もしくはサイレント変異が導入された混合集団のポピュレーション推移を NGS を用いて解析したところ、<i>in vitro</i> での継代期間に応じた KO 変異株の割合が減少していた。培養条件において TgGP が原虫増殖の適合性に寄与していることが明らかとなった。 確立されたポピュレーション追跡手法を用いて、潜伏感染状態のマウスの脳から得られたサンプルの解析を進めた。TgGP の活性型変異を導入された原虫と野生株の混合集団を腹腔内に投与後、感染後 1 か月目の感染感染マウスから回収した虫体では活性型変異原虫は野生株と同等程度存在していたのに対して、感染後 3 か月目では活性型変異原虫の割合が増加している傾向がみられた。野生型原虫と変異原虫の集団構成について同一の実験群の中でもマウスごとにばらつきが見られた。ばらつきの原因としては脳組織へ原虫が移行する際に少数の原虫が絞込まれている「ボトルネック効果」を受けていることが挙げられる。今後は投与する原虫の数を増やしてボトルネックを通過する際の原虫数を増やす、もしくは解析するマウスの個体数を増やすなどして、より頑強に潜伏感染時のポピュレーション推移を観察する予定である。
研究成果の 発 表	特記事項なし

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 12 日

採択番号	2021-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	白藤 梨可
研究課題名	分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるフタトゲチマダニの胚発生に及ぼす影響		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	たなか てつや 田仲 哲也	鹿児島大学 共同獣医学部・教授	
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・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マダニにとって必須の生存基盤は宿主動物からの吸血・消化にあり、血液消化産物中に含まれる大量の鉄がマダニ体内に放出される。鉄から被る酸化ストレスへの応答は、吸血や産卵を左右する重要な機構である。マダニ生存基盤である吸血における鉄は卵の胚発生にも影響し、その鉄代謝の制御にはフェリチンが関与している可能性が考えられる。研究代表者らはその鉄代謝の制御を担う分子として、分泌型フェリチンに着目し、分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるマダニの胚発生に及ぼす影響について、胚発生のステージごとに検証した。また、鉄イオン濃度を測定することによって、鉄イオン濃度の動態と胚形態の相互関係を明らかにした。		
研究経過の概要	【研究目的】 マダニによる感染症を制御するためには、マダニの生体機能を理解することが不可欠である。しかし、マダニ胚発生における FER などの抗酸化分子の発現動態については不明な点が多い。そこで本研究では、分泌型 FER (FER2) 遺伝子ノックダウンした発育胚について、各経過日の発育胚 (Day 1、Day 5、Day 10、Day 15、Day 20) に含まれる鉄イオン濃度の動態と (FER2) タンパク質の局在を調べることによって、胚発生における両者の機能を明らかにすることを目的とした。 【材料と方法】 FER2 遺伝子ノックダウンしたフタトゲチマダニの発育胚について、Scale 法の手法に従い透明化を行った。透明化技術によって透明化したマダニの発育胚について、DAPI を用いて核染色をした後、蛍光顕微鏡で観察を行って、胚発生のステージを同定した。また、ノックダウンによって胚形態に及ぼす影響について観察した。さらに、Quantichrome™ iron assay kit を用いて、ホモジナイズした各経過日のノックダウンした発育胚 (Day 1、Day 5、Day 10、Day 15、Day 20) に含まれる二価鉄イオンならびに三価鉄イオンの濃度を測定した。		

研究成果の概要	【結果】 <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群においても、発育胚における <i>FER2</i> 蛋白質の発現が観察され、対照群との間に、発現量や局在の違いは認められなかった。両群ともに、1 日目から 20 日目までの全経過日において胚細胞の細胞質内に <i>FER2</i> 蛋白質の蛍光が観察され、20 日目において、脚の中心部に強い蛍光が観察された。また、胚形態の観察およびステージ分類を行った結果、対照群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間で、胚形態やステージの割合に明らかな違いは認められなかった。さらに、全ての経過日において、<i>FER2</i> 遺伝子ノックダウンした胚に含まれる二価鉄イオンならびに三価鉄イオンの濃度に有意な差は認められなかった。 【考察】 RNA 干渉法を用いて、フタトゲチマダニの <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウンを行った場合であっても、雌成ダニに残存している <i>FER2</i> 蛋白質が、発育胚に移行することが考えられた。また、10 日目以降において、無処置群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間に <i>FER2</i> 蛋白質の発現量および局在に差は見られなかった。この結果から、<i>FER2</i> 遺伝子のノックダウンは、胚由来の <i>FER2</i> 遺伝子の発現に影響を及ぼさない可能性が考えられる。胚形態の観察およびステージ分類を行った結果、無処置群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間に、胚形態やステージの割合に違いは認められず、孵化率についても差は認められなかった。以上の結果より、RNA 干渉法を用いた <i>FER2</i> 遺伝子のノックダウンは、雌成ダニの吸血および卵形成を阻害するが、胚発生には影響を及ぼさないことが示唆される。
研究成果の発表	【学会発表(予定)】 島崎 慧, Emmanuel Pacia Hernandez, 新原博子, <u>白藤(梅宮)梨可</u>, 藤崎幸蔵, <u>田仲哲也</u>, フタトゲチマダニ胚発生におけるフェリチンの発現動態, 第 91 回日本寄生虫学会, 帯広畜産大学, 2022 年 5 月(北海道)

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: June 2, 2022

Project no: 2021-joint-7

1. Principal investigator

Name: Morakot KAEWTHAMASORN

Position: Associate professor

Affiliation: Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

2. Project title:

Pathogenicity of the buffalo malaria parasites

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Masahito Asada

Position: Associate Professor

4. Research period (in mm/dd/yyyy, and total number of years)

April 1, 2021–March 31, 2022 (1-year continuing project)

5. Purposes and objectives

This study aimed to study on pathogenicity of *Plasmodium bubalis* infection in buffalo calves and its vector.

6. Outline of research process

We carried out several surveys in Thailand i) from Asian water buffaloes in smallholder farms in Nakhon Ratchasima in December 2019 (n = 22); ii) from Murrah dairy buffaloes in Chachoengsao in June 2020 (n = 45); iii) in November 2021 (n = 45) and iv) from Asian water buffaloes in smallholder farms in Nan in December 2020 (n = 65). All blood samples (n=177) were collected from the jugular vein of buffaloes and kept in ACD tubes. DNA samples from buffalo blood underwent nested PCR screening for *Plasmodium* using primers DW2 and DW4 targeting cytochrome b (*cytb*) gene as the outer primers and NCYBINF and NCYBINR for the inner primers. Subsequently, *Plasmodium*-positive samples were further confirmed using primer sets targeting the cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) and 18S ribosomal RNA (*18S*) genes.

Naturally infected buffalo, which has already been confirmed by microscopic examination and molecular diagnostic, was followed up for 14 consecutive days. Afterward, the infected buffalo was monitored weekly until day 56. During the observation period, the following data were collected: body temperature, clinical signs, anemia, and appetite. Every day for 14 consecutive days, one ml of blood samples was drawn from the jugular vein and kept in a tube containing ACD solution (two infected

buffaloes). Blood samples from infected buffaloes were examined by nested PCR and qPCR for each day. Parasite burden was measured by real-time quantitative PCR. Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using P_{pubCox1-F32} and P_{pubCox1-4B3} primers. Parasitemia levels were counted from thin blood smears under a microscope.

A total of 1,652 female mosquitoes were collected from two sampling sites Chachoengsao (n = 1,571) and Ratchaburi (n = 81) (Table 5). Anopheline mosquitoes and non-Anopheline mosquitoes were screened for the presence of malaria parasites. Adult female mosquitoes were grouped based on their morphology. A total of 268 female mosquitoes (214 *Anopheles* spp., 24 *Culex* spp., 24 *Aedes* spp., and 6 *Mansonia* spp.) were examined. Among 214 *Anopheles* spp., 133 were collected from a buffalo farm where concurrently water buffalo samples were shown to be *P. bubalis* positive). Anopheline mosquitoes were carefully dissected within three days after collection to obtain the salivary glands of each mosquito. Mosquito pools were made (head and thorax including dissected salivary glands) following morphological identification and were subsequently confirmed by molecular identification. Each pool was made up of one to three mosquitoes from the same groups depending on sample availability. DNA samples extracted from mosquitoes were subjected to PCR screening for *P. bubalis* based on *cytb*, *cox1*, and 18S rRNA genes. *Plasmodium*'s-positive samples that underwent PCR confirmation were subsequently subjected to sequencing. Anopheline mosquito species were conducted by sequencing the PCR products targeting *cox1*, cytochrome c oxidase subunit 2 (*cox2*), and internal transcribed spacer 2 (*ITS2*) markers.

7. Outline of research achievements

7.1 Detection of malaria parasite in blood samples

A total of 177 buffalo blood samples were collected and underwent screening for *P. bubalis* infection. We found that 2 out of 45 buffaloes in Chachoengsao collected in 2020 (THBuff20_37 and THBuff20_39) tested positive for the malaria parasite from day 1 after observation until day 49, being undetected. Parasite burden was measured by real-time quantitative PCR. Parasite burden in both buffaloes was detected as low as 15×10^4 copies per microliter of blood sample until day 28, as shown in Figure 1. Co-infection was detected in both infected buffaloes. *Theileria* sp. and *Anaplasma* sp. were detected in THBuff20_37, while THBuff20_39 was co-infected with *Theileria* sp only. All co-infection were tested by PCR using published primers PanPiroF1 and PanPiroR1 for piroplasma infection and EhrliAnaplas16SR5U-EhrliAnaplas16SR3U/ EhrliAnaplas16FWD-EhrliAnaplas16REV for *Anaplasma* infection. We recorded that the buffalo which were infected by *P. bubalis* had no symptoms. Body temperature in both infected buffaloes showed no significant deviation from normal ranges during the observation period (Figure 2). During the infection, the trophozoite stage was predominated. Evaluation of parasitemia levels Giemsa-stained blood smears were recorded as low parasitemia (<0.01-0.09%) for 14 consecutive days.

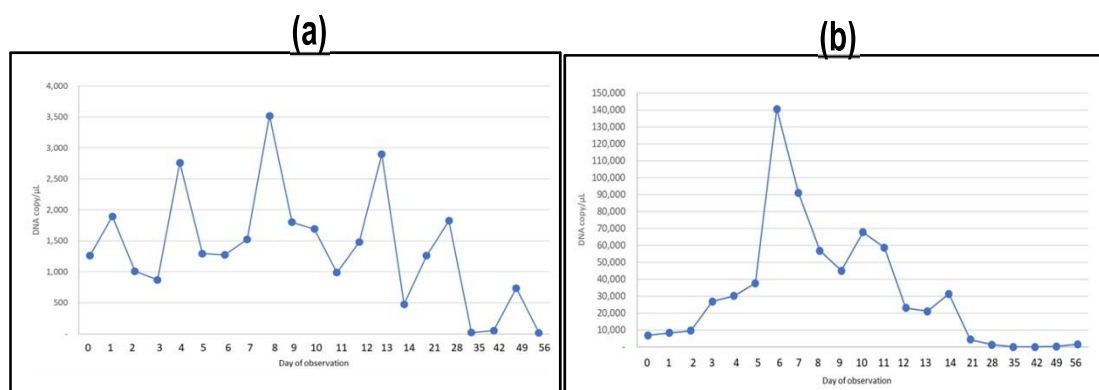


Figure 1. Malaria parasite's copy number measured by qPCR in buffalo during the observation period (a) THBuff20_37, (b) THBuff20_39

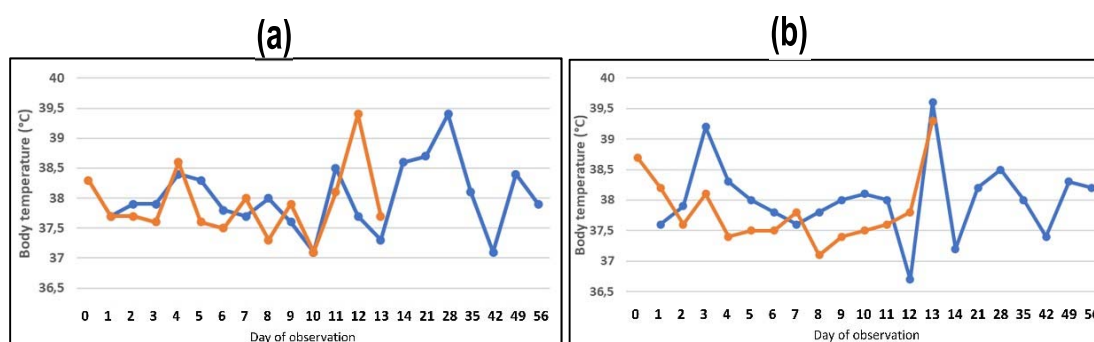


Figure 2. Body temperature malaria-infected buffaloes during observation period (a) THBuff20_37, (b) THBuff20_39. Blue and orange lines indicate the observed temperature in the morning and evening, respectively.

7.2 Morphological identification of mosquitoes' samples

Among collected mosquitoes, anopheline mosquitoes accounted for 13.01%, 70.94% for *Culex* spp., 12.41% for *Aedes* spp., 0.36% for *Mansonia* spp., and 3.27% were unidentifiable due to body part's destruction. Among 214 identified anopheline mosquitoes, nine different *Anopheles* spp. were identified belonging to Barbirostris, Hyrcanus, Funestus, Ludlowae, and Jamesii groups. *An. peditaeniatus*, which is a member of the Hyrcanus group, was predominant in the buffalo farm in Chachoengsao, while *An. aconitus* was the most common mosquito on the Ratchaburi buffalo farm, as depicted in Figure 3.

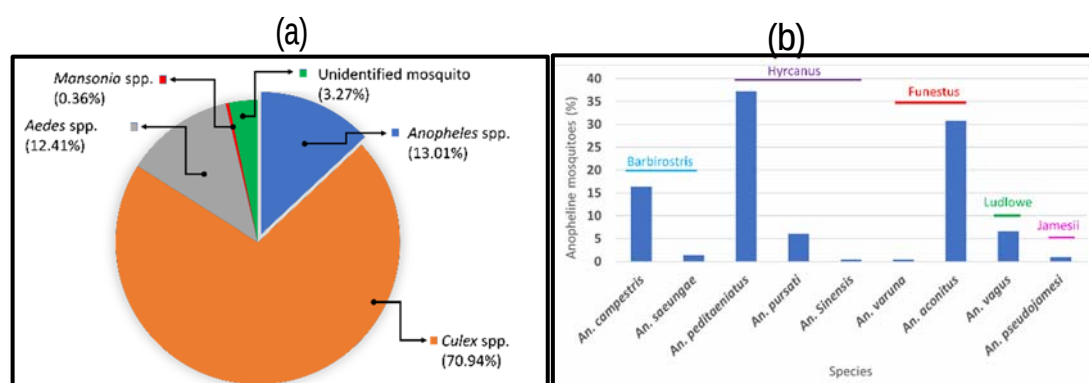


Figure 3. Chart illustrating the number of mosquitoes, according to morphological identification. (a) Percentages of each genus collected in this study as shown above. (b) *Anopheles* mosquitoes collected from buffalo farms based on group and species.

7.3 Molecular identification of anopheline mosquitoes

Among collected anopheline mosquitoes, 128 (59.81%) were selected for DNA extraction, which was made up of 102 pools per species depending on the availability of mosquitoes (1-3 individuals per pool). The number of each pool was subjected for sequencing and the results as follows: *An. wejchoochotei*/*An. campestris* (n = 35, 23 pools), *An. peditaeniatus* (n = 80, 46 pools), *An. vagus* (n = 14, 7 pools), *An. varuna* (n = 1, 1 pool), *An. pseudojamesi* (n = 2, 1 pool), *An. saeungae* (n = 3, 3 pools), *An. pursati* (n = 12, 12 pool), and *An. aconitus* (n = 66, 8 pools) *An. sinensis* (n = 1, 1 pool) (Table 1).

Table 1. Summary of *P. bubalis*'s PCR screening results of anopheline mosquitoes collected from the buffalo farm

Sampling sites	Group	No. collected	No. of pools	No. of positive pools			No. of pools sequenced for mosquito genes and determined species name
				18S	cytb	cox1	
Chachoengsao	Barbirostris	35	23	2	2	2	17 (<i>An. wejchoochotei</i> or <i>An. campestris</i>)
	Hyrcaus	80	46	1	1	1	15 (<i>An. peditaeniatus</i>),
		1	1	0	0	0	1 (<i>An. sinensis</i>)
	Funestus	1	1	0	0	0	1 (<i>An. varuna</i>)
	Ludlowae	14	7	0	0	0	6 (<i>An. vagus</i>)
	Jamesii	2	1	0	0	0	1 (<i>An. pseudojamesi</i>)
Ratchaburi	Barbirostris	3	3	0	0	0	1 (<i>An. saeungae</i>)
	Hyrcaus	12	12	0	0	0	5 (<i>An. pursati</i>)
	Funestus	66	8	0	0	0	8 (<i>An. aconitus</i>)
Total		214	102	3	3	3	55

7.4 Molecular detection of *P. bubalis* in mosquito samples

Out of 79 pools of anopheline mosquitoes originating from Chachoengsao, three pools were PCR positive for *Plasmodium*. These samples were *An. wejchoochotei*/*An. campestris* (IDs THMosqBuff20_P6_3, THMosqBuff20_P8_2), and *An. peditaeniatus* (ID THMosqBuff20_P20_3) (Table 6). The MIR (%) was calculated at 5.7 (0.015-0.186) in *An. wejchoochotei*/*An. campestris* and 1.9 (0.003-0.101) in *An. peditaeniatus* (Table 2). None of the 54 non-anopheline mosquitoes from the buffalo farm were PCR positive for *Plasmodium*.

Table 2. Minimum infection rates of *Plasmodium bubalis* from collected mosquitoes

Species	Total no. mosquitoes	Pool size (range)	No. tested	No. positive pools	MIR (%) (95%, CI)
<i>An. campestris</i> or <i>wejchoochotei</i>	35	1-3	35	2	5.7 (0.015-0.186)
<i>An. peditaeniatus</i>	80	1-3	52	1	1.9 (0.003-0.101)

8. Publication of research achievements

Nugraheni YR, Arnuphapprasert A, Nguyen TT, Narapakdeesakul D, Nguyen HLA, Poofery J, Kaneko O, **Asada M** and **Kaewthamasorn M** 2022. Myzorhynchus series of Anopheles mosquitoes as potential vectors of *Plasmodium bubalis* in Thailand. Sci Rep. 12(1): 5747. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09686-9>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 10 日

採択番号	2021-共同-8		
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	白藤 梨可
研究課題名	カブリダニの卵形成の分子機構解明と人工飼料開発への応用		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	(すずき たけし) 鈴木 丈詞	東京農工大学大学院農学研究院・准教授	
研究分担者	(もり こうたろう) 森 光太郎	石原産業株式会社中央研究所・グループリーダー	
	(おさかべ まさひろ) 刑部 正博	京都大学大学院農学研究科・准教授	
	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・准教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	捕食性天敵であるカブリダニ類は、薬剤抵抗性が発達しやすいハダニ類に対する持続可能な生物的防除資材として、半世紀以上にわたって利用されてきた。ハダニ類に対する主要な天敵製剤として、国内では、チリカブリダニ (<i>Phytoseiulus persimilis</i>) 剤およびミヤコカブリダニ (<i>Neoseiulus californicus</i>) 剤が市販されている。2017 年の統計では、これらカブリダニ剤の国内出荷金額は約 7 億円であり、近年増加傾向である。ただし、この金額は、殺虫剤全体の国内出荷金額のわずか 0.6%程度である。さらなる普及拡大のためには効率的なカブリダニ剤の生産体制の構築が必要である。 ミヤコカブリダニは国内土着種であり、ハダニ類のみ摂食するチリカブリダニと異なり、その大量生産には、ハダニ類の他に、害虫とならない節足動物あるいは花粉が餌として用いられている。しかし、これら天然物の管理は煩雑であり、安定的なミヤコカブリダニ生産のボトルネックとなっている。 他方、同じダニ目に属するマダニ類では、卵形成の分子機構研究が進展し、栄養シグナル伝達を担う Target of rapamycin (TOR) 経路によって卵黄タンパク質前駆体であるビテロジェニン (Vg) の合成が制御されることが判明している。そこで本研究では、このマダニ類の卵形成の専門家である白藤(共同研究担当教員)との連携のもと、ミヤコカブリダニの TOR 経路や Vg 合成系で機能する遺伝子群を分子マーカーとし、卵形成を促す栄養成分のスクリーニングと、栄養シグナル伝達の分子機構の解明を目指す。		

研究経過の概要	ミヤコカブリダニ卵からゲノム DNA を抽出し、illumina 社の NovaSeq 6000 System を用いたショートリードシーケンシング(リード長:150 bp、読み取り深度:81.24×)を実施した。得られた総リードから低品質のリードを除去し、クリーンリード(リード数:102,279,784)を作成した。これらクリーンリードをアセンブリに使用し、8895 のコンティグを構築した(N50:99.85 kb)。 次に、Oxford Nanopore Technologies 社の MinION を用いたロングリードシーケンシングを実施した。得られた総リードから低品質のリードを除去し、クリーンリード(リード数:6,501,331)を作成した(N50:2.538 kb、読み取り深度:115.44×)。 そして、得られたショートリードとロングリードの両データを用いたハイブリッドアセンブリを実施した。 なお、研究代表者、研究分担者および共同研究担当教員は、オンライン会議やメールで進捗状況について適宜ディスカッションし、緊密な連携のもと研究計画を遂行した。
研究成果の概要	ハイブリッドアセンブリによりミヤコカブリダニのドラフトゲノムを決定した。そのコンティグ数、N50 およびゲノム長は、それぞれ 264、1.359 Mb および 179.6 Mb であった。また、BUSCO 値(節足動物の遺伝子データセット)は 94.4%であった。これら値は、すでに先行してゲノム解析が進められてきた近縁種のククメリスカブリダニ(<i>Neoseiulus cucumeris</i>)やオキシデンタリスカブリダニ(<i>Galendromus occidentalis</i>)のドラフトゲノムのそれらと同等であった。 現在は、近縁種の遺伝子モデルを用い、遺伝子領域の推定を進めている。今後は、このゲノム情報を基盤としたトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を実施し、特に TOR 経路や Vg 合成系に焦点を当て、卵形成に資する分子マーカーを選定していく。そして、その分子マーカーを用いた卵形成を促す栄養成分のスクリーニングを実施する。卵形成を促す栄養成分が特定されれば、それを導入した人工飼料の開発に進み、ミヤコカブリダニの安定的な大量生産体制の構築へと展開していく。
研究成果の発表	武田直樹, N.A. Ghazy, 鈴木伽奈, 片岡孝介, 由良敬, 白藤(梅宮)梨可, 森光太郎, 刑部正博, 鈴木丈詞(2022)ミヤコカブリダニのゲノム全塩基配列解読:ゲノム情報を利用した天敵育種への展望. 第 66 回日本応用動物昆虫学会大会, オンライン開催, 2022 年 3 月 20~22 日(口頭)

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 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) 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・人獣共通感染症国際共同研究所・准教授	
研究分担者			
	あさだ まさひと 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	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。		
研究経過の概要	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。 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。		

研究成果の概要	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。 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。 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)。 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。 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。
研究成果の発表	特記事項なし。

Table 1				
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				

Table 2				
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

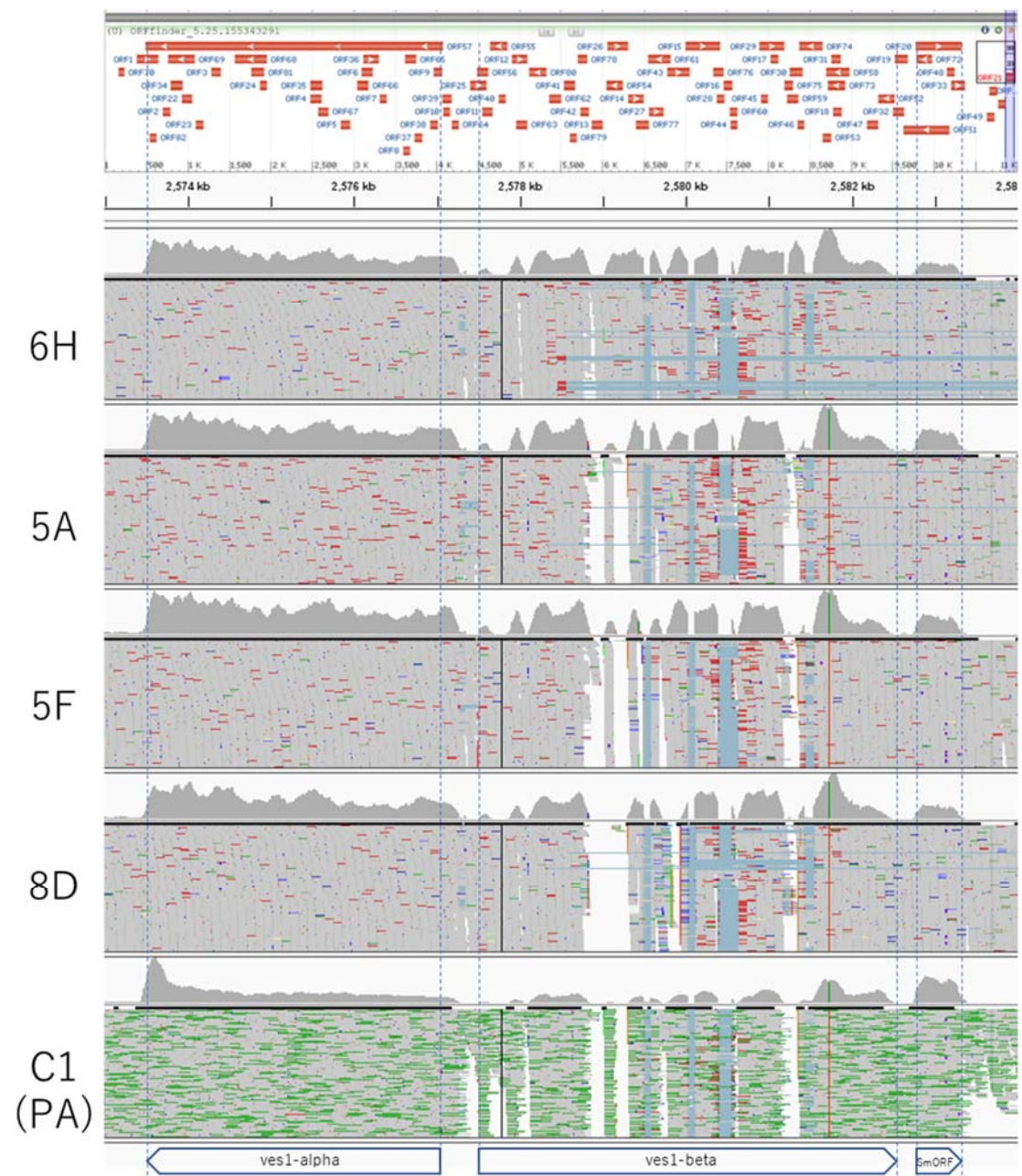


Figure 1

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 2 日

採択番号	2021-共同-10		
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	トキソプラズマのプログラム細胞死メカニズム解明に向けた研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	またに たつのり 正谷 達膳	岐阜大学応用生物科学部・准教授	
研究分担者			
	げん がくなん 玄 学南	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	病原性原虫のプログラム細胞死機構を詳細に知ることは、新規創薬考案のヒントとなりうる。本研究ではトキソプラズマを対象とし、その細胞死シグナル機構を解明することを目的とする。細胞死に先駆けて発現上昇する遺伝子を対象とし、ゲノム編集に基づくノックアウト原虫を作出する。作出されたノックアウト原虫の性状、特にプログラム細胞死への影響を検討することで、当該遺伝子のプログラム細胞死への寄与を評価する。		
研究経過の概要	トキソプラズマ細胞死関連遺伝子を探索し、その遺伝子発現量をリアルタイム PCR にて定量することで、これら遺伝子が細胞死に関連することを確認できた。 これら遺伝子をノックアウトするため、各遺伝子の特異的 guide RNA 配列を挿入した CRISPR/Cas9 ベクターを作製し、トキソプラズマ RH 株に導入した。しかし、いずれの遺伝子もうまく KO できなかったことから、guide RNA の再設計による再検討または薬剤添加時のみ目的遺伝子の発現量を一過性に減少させる目的で、コンディショナルノックアウト法の確立が必要と考えられた。 マラリア、バベシアで活用されているコンディショナルノックアウト法である、glmS リボザイム配列を用いた方法に注目し、トキソプラズマでも可能かどうかを検討した。しかし、トキソプラズマでは本実験系がうまくいかない可能性が示された。コロナ禍での移動制限のため、電話またはメールでの情報のやりとりによる共同研究となった。		

研究成果の概要	はじめにトキソプラズマ細胞死関連遺伝子を探索した。データベース ToxoDB 及び、すでに報告されているトキソプラズマ細胞死関連遺伝子に関する論文 (Ni Nyoman et al., Apoptosis, 2013) を参考に、PDCD2、BI-1 及び ELMO1 に注目した。トキソプラズマ RH 株に細胞死誘導薬剤として知られるスタウロスポリンで処理し、これら遺伝子の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。その結果、いずれの遺伝子も発現上昇が認められた。 これら遺伝子をノックアウトするため、各遺伝子の特異的 guide RNA 配列を挿入した CRISPR/Cas9 ベクターを構築し、Nucleofector 2b を用いて導入した。しかし、目的のノックアウト原虫を得ることができなかった。次に、相同組換えに基づくノックアウト法を試みる目的で、ベクターを構築し、これを Nucleofector 2b を用いて導入し薬剤により選抜を試みた。しかし、3 度の試みにもかかわらず、目的のノックアウト原虫を得ることができなかった。 薬剤添加時のみ目的遺伝子の発現量を一過性に減少させる目的で、コンディショナルノックアウト法の確立を試みた。glmS リボザイム配列を目的遺伝子終止コドン直後に配置するコンディショナルノックアウト法をトキソプラズマでも実施可能かどうか検証する目的で、現在、EGFP 遺伝子に glmS リボザイム配列を付したものを発現させるようプラスミドを構築し、トキソプラズマ RH 株に導入・クローニングすることで、RH-EGFPglmS 株の作出を試みた。しかし、樹立した RH-EGFPglmS 株に、コンディショナルノックアウト誘導試薬であるグルコサミンを、宿主細胞への致死量以下の様々な濃度で添加したものの、EGFP の発光低下はみられなかった。そのため、マラリアやバベシアで可能なコンディショナルノックアウト法である glmS リボザイム法は、トキソプラズマに適用することは困難である可能性が示された。今後は、トキソプラズマですでに確立されているオーキシン誘導デグロン法を適用し、遺伝子コンディショナルノックアウト原虫の樹立を目指す。
研究成果の発表	なし。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 20 日

採択番号	2021-共同-11		
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	麻田 正仁
研究課題名	Bar-seq を用いたウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いしざき たかひろ 石崎 隆弘	ウメオ大学分子感染医学研究所・特別研究員	
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	
	あさだ まさひと 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	<i>Babesia bovis</i> はウシ赤血球に寄生する原虫であり、感染宿主に発熱、貧血、血色素尿といった病態を引き起こすことから獣医学領域においてその制圧が課題となっている。ウシバベシア症対策として生ワクチンやジミナゼン等の薬剤が使用されているが安全性及び薬剤耐性原虫出現のリスクといった問題点から、安全で効果的な抗原虫薬やワクチンの開発が求められている。バベシア原虫は全長 8.2Mbp からなる 4 つの染色体を持ち、約 3700 個のタンパク質をコードする遺伝子を有している。宿主に病態を引き起こす赤血球期において発現する、原虫特異的かつ原虫の生存に必須な分子は治療薬やワクチンの標的分子として有望である。そのため赤血球期における必須遺伝子を明らかにすることはウシバベシア症制圧に向けた基礎研究として重要な意味を持つ。本研究ではネズミマラリア原虫の遺伝子必須性解析において既に報告のある Bar-seq ライブラリ技術 (Pfander <i>et al.</i>, 2011; Gomes <i>et al.</i>, 2015; Bushell <i>et al.</i>, 2017) をバベシア原虫へと応用することで、<u>赤血球期におけるバベシア原虫の必須遺伝子を同定することを目的とする。</u>		

研究経過の概要	初年度は共同研究者である麻田先生より実験試料であるバベシア原虫ゲノム DNA の提供を受けた。バベシア原虫 DNA をシリンジを用いて裁断、精製した後に pJazz ベクターへの挿入を行なった。サンガーシーケンス法による 1000 プラスミドの解析を実施するにあたり、後述する長鎖相同組換えベクターを用いることが最も効率の良い手法か疑問点が生じたため本解析を一時中断している。 現所属が保有しているバーコード配列を保有する PlasmogEM ライブラリー技術は CRISPR/Cas9 システムがアピコンプレクサ門原虫で報告される以前は強力な手法であった。近年マラリア原虫、トキソプラズマ原虫、バベシア原虫での CRISPR/Cas9 系が報告され、トキソプラズマ原虫では CRISPR/Cas9 ライブラリーを用いた大規模な遺伝子必須性及び必須遺伝子機能のスクリーニング解析が実施された。一方、マラリア原虫やバベシア原虫では c-NHEJ 経路を欠損しているため遺伝子の修復にはドナー配列の付与が必要となる。
研究成果の概要	組換え時のドナー配列の長さは一般的に 500bp と大規模スクリーニングに適さない長さが必要と考えられていたが、我々の研究室は 50bp という短鎖のドナー配列が遺伝子修復に充分であるという知見を見出した(学会発表 1)。さらに必須遺伝子の機能解析スクリーニングを可能とするエピトープタグ挿入型遺伝子ノックダウン手法も確立した(学会発表 1)。マラリア原虫で CRISPR/Cas9 系に関する知見が実際にバベシア原虫の遺伝子スクリーニング手法に応用可能かどうか？また、長鎖相同組換え領域を有するプラスミドを用いて遺伝子編集が可能か？という 2 点を実際の原虫を用いて検討した後に今後の実験方針を決定したい。また、手法の最適化を検討するにあたり PlasmogEM や CRISPR/Cas9 系を用いた原虫遺伝子の genetic screen に関する知見をまとめた総説が受理された(発表論文 1)。
研究成果の発表	<学会発表> 1. Ishizaki T., Bushell E. An effective CRISPR/Cas9 system using short length homology repair template for genetic modification of <i>Plasmodium berghei</i>. BioMalPar XVIII Heidelberg, Germany, May 2022 <発表論文> 1. Ishizaki T., Hernandez S., Paoletta M.S., Sanderson T., Bushell E.S.C. CRISPR/Cas9 and genetic screens in malaria parasites: small genomes, big impact. Biochemical Society transactions. 2022 (in press).

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 5 日

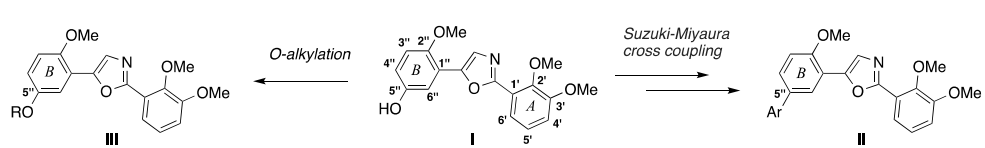
採択番号	2021-共同-12		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼 啓輔
研究課題名	Establishment transgenic manipulation of <i>Trypanosoma equiperdum</i> using of CRISPR/Cas9 and RNAi		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Mark Carrington	Department of Biochemistry, University of Cambridge, Professor	
研究分担者	Oliva Macleod	Department of Biochemistry, University of Cambridge, Post-Doctoral Research Assistant	
	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・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	節足動物の吸血に伴う生物学的もしくは機械的伝播により媒介される他種トリパノソーマと異なり、ウマ属特有の疾病である媾疫の病原体である <i>Trypanosoma equiperdum</i> は交尾により感染伝播する。さらに感染哺乳類体内で血中ではほとんど検出されず、生殖器粘膜や皮膚など組織に高い親和性を示す特異な性質を有する。細胞外寄生するアフリカトリパノソーマであるが、脳脊髄液への侵入や脂肪組織への潜伏感染など、組織とのコンタクト(接着)がトリパノソーマの寄生適応と病原性の鍵となっている可能性がある。そこで <i>T. equiperdum</i> を対象として、<i>T. equiperdum</i> の特異な寄生動態に関わる遺伝子の機能解析を試みた。本研究では <i>T. equiperdum</i> の培養系を有する原虫研先端予防治療学分野に、研究代表者が CRISPR/Cas9 をもちいた遺伝子組換え原トリパノソーマ作製用プラスミドの構築と提供を行う。研究分担者は分与プラスミドをもちいた遺伝子組換え <i>T. equiperdum</i> の樹立を目指した。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開および遺伝子組換えトリパノソーマ作製用プラスミド提供後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者はトリパノソーマの維持に努めた。		
研究成果の概要	関連研究の成果として、<i>T. equiperdum</i> での遺伝子組換え原虫の作製を目指して、複数株の <i>T. equiperdum</i> のゲノム解析およびトランスクリプトーム解析により <i>T. equiperdum</i> に特異的に発現する解析候補遺伝子を特定した。現在、それらの中から遺伝子組換え原虫を用いた機能解析を行う標的遺伝子の検討を進めている。		

研究成果の 発 表	特になし。
--------------	-------

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 2 日

採択番号	2021-共同-13		
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	菅沼 啓輔
研究課題名	安全性の高いトリパノソーマ症新規治療薬の開発を目指した モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾール誘導体の合成と活性評価		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	なりた こういち 成田 紘一	東北医科薬科大学・薬学部・助教	
研究分担者	むらた としひろ 村田 敏拓	東北医科薬科大学・薬学部・講師	
	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	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	これまでに申請者らはモンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾール化合物を標的化合物とした創薬研究を展開してきた。有機合成化学的手法により天然物のみならず、多種多様な類縁化合物を創製し、その抗トリパノソーマ活性評価を行なっている。 これまでの研究成果から天然物よりも優れた活性を示す化合物を見出すことができたものの、溶解性が悪く扱いにくい欠点を持っていた。そこで、溶解性改善と活性増強を狙い更に類縁化合物の合成を行う。また、構造最適化の手がかりを得るため、天然からの候補化合物の探索も並行して行う。これらの研究を通して安全性の高いトリパノソーマ症治療薬の開発を目指す。		
研究経過の概要	1. 新規類縁化合物の設計と合成 昨年度までに確立した類縁体合成法を用い、B 環部 5 位におけるアルキル基やアリール基の置換基が生物活性に与える影響を明らかにするため、類縁体の合成を行った(成田)。 2. 天然資源からの新規物質の探索 これまで当グループで見出し報告してきた抗トリパノソーマ活性化合物と同様の骨格を有する化合物を継続的に探索した(村田)。 上記 1 および 2 で得た化合物について随時、5 種類の病原性トリパノソーマ <i>Trypanosoma congolense</i>, <i>T. brucei brucei</i>, <i>T. evansi</i>, <i>T. b. rhodesiense</i>, <i>T. b. gambiense</i> に対して抗トリパノソーマ活性を評価した。また細胞毒性 (MDBK ウシ腎臓細胞株) を評価した(菅沼)。 COVID-19 パンデミックのため、サンプルは郵送でやり取りをし、その結果についてメールおよび web 会議にてディスカッションを行った。		

研究成果の 概 要	昨年度、モンゴル国薬用植物由来 2,5-ジフェニルオキサゾールの B 環部 5 位における構造修飾に焦点を当てた類縁化合物合成法の検討から以下の 2 つの手法を確立している。すなわち、① 鈴木-宮浦クロスカップリング反応によるアリール基の導入 (I → II) および ② O-アルキル化反応によるアルキル基の導入 (I → III) である。そこで、これらの方法論を用いて様々な置換基を有する類縁化合物の合成を行った。5 位にベンジルオキシ基を有するプロモアセトフェノンを出発物質として用い、オキサゾール環の構築、接触水素化反応を経てフェノール I を合成した。フェノール I に対し、① の方法論に従い、種々のボロン酸を用いて反応を行うことでフェニル基上にメキシ基、アルキル基、ハロゲン、ピリジル基、フリル基、チエニル基などを有する類縁体を合成した。また、② の方法論によりシクロヘキシル基あるいはフェニルエチル基を有する化合物の合成を行った。  昨年度までに得られている知見から、5 位にフェニル基やベンジルオキシ基を有する化合物が <i>T. congolense</i> に対する選択的な抗トリパノソーマ活性と MDBK 細胞に対する低い細胞毒性を示すことが明らかとなっている。しかし、今回合成した化合物はそれらの化合物と非常に類似した構造を有しているにも関わらず、非常に弱い抗トリパノソーマ活性を示した。この原因として、構造的な変化により化合物の溶解性が低下しており、DMSO へ溶解しづらいことが一因として考えられた。現在、試験濃度について検討を行っており、各化合物が溶解する適切な濃度の溶媒を用いて再度試験を実施する予定である。 上記課題を解決するために、極性溶媒への溶解性向上を狙って化合物 I のグリコシル化反応について検討を行った。反応条件について検討を行ったところ、化合物 I に対する相間移動触媒を用いた D-グルコース誘導体のグリコシル化反応が進行し、中程度の収率ながら目的のカップリング体を得ることができた。さらに、アセチル基の除去を行うことで O-グリコシド体へと導くことができた。現在、本化合物の活性評価を行っている。 今後、得られた知見を基に更なる構造展開を行い、優れた抗トリパノソーマ活性を示す新規化合物の創製を目指したいと考えている。
研究成果の 発 表	<論文> Synthesis and evaluation of trypanocidal activity of derivatives of naturally occurring 2,5-diphenyloxazoles, Koichi Narita, Keisuke Suganuma, Toshihiro Murata, Ryutaro Kondo, Hiroka Satoh, Kazuhiro Watanabe, Kenroh Sasaki, Noboru Inoue, Yuichi Yoshimura, <i>Bioorg. Med. Chem.</i>, 42, 116253 (2021). <学会発表> 天然由来の 2, 5-ジフェニルオキサゾール誘導体の合成と抗トリパノソーマ活性評価、成田紘一、菅沼啓輔、村田敏拓、近藤龍太郎、佐藤廣河、渡邊一弘、佐々木健郎、井上昇、吉村祐一、日本薬学会第 142 年会、名古屋(オンライン開催)、2022 年 3 月、演題番号 28PO9-pm1-15。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 9 日

採択番号	2021-共同-14		
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	福本 晋也
研究課題名	ネズミマラリア原虫における Brca2 による雌ガメートサイトへの分化		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	よしかわ やすなが 吉川 泰永	北里大学獣医学部・准教授	
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	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マラリア原虫における雌雄ガメートサイトへの分化は、マラリア原虫の生活環において必須のステージである。我々は相同組換え修復に関係する Brca2 の研究を行ってきた。ネズミマラリア原虫においても Brca2 の特徴をもつタンパク質がデータベース上に存在したので、ノックアウト原虫を作製した。予想外なことに、ノックアウト原虫において雌雄ガメートサイト比率が変化し、雌ガメートサイトへの分化が抑制される結果が得られた。そこで本研究では、ネズミマラリア原虫において Brca2 がどのように雌ガメートサイトへの分化に貢献しているのかを解明することを目的とした。		
研究経過の概要	貴研究センターの福本先生に Brca2 のノックアウト原虫を作製していただき、吉川がこのノックアウト原虫の解析を行ってきた。2021 年度はコロナウイルス感染症流行のため、貴研究センターを訪問する事が難しかったので、適宜、メールによるディスカッションを行い、共同研究を遂行した。その結果、以下の研究成果の概要に示すようにマラリア原虫における Brca2 の重要性が徐々に明らかになり始めた。これまでに得られた成果を現在論文にまとめ投稿中である。 貴研究センターへの旅費を計上していたが、前述のように訪問することが出来なかったため、その分の予算は共同研究の遂行に必要な消耗品の購入に充てた。		

研究成果の 概 要	(1) 病原性に対する影響 前年度までに Brca2 ノックアウト原虫において赤血球感染率の低下とマウスに対する病原性が低下することを示した。さらに今年度、Brca2 ノックアウト原虫において赤内型のステージ比率を調べたところ、リング期が増加し、トロフォゾイト期が減少した。この結果は Brca2 がリング期からトロフォゾイト期への発育に貢献していることが予想され、このことが赤血球感染率の低下につながると考えられた。 (2) スポロゾイトに対する影響 前年度までに Brca2 ノックアウト原虫においてガメトサイトの形成数、接合した後のオーカイネート形成数およびオーシスト形成数が低下することを示した。今年度はオーシスト内で発育し、蚊の唾液腺に移行するスポロゾイトに着目して解析した。まず、蚊に感染後 28 日目の唾液腺を採材し、唾液腺にスポロゾイトが存在するか観察した。Brca2 ノックアウト原虫においては全くスポロゾイトが観察されなかった。次に感染後、7,14, 21 日目の中腸を採在し、オーシストにおけるスポロゾイトの発育を電子顕微鏡により観察した。Brca2 ノックアウト原虫は 7 日目までは野生型と同程度の発育を示したが、それ以降スポロゾイトの形成は観察できなくなり、21 日目では、オーシストが退縮していく様子が観察された。また、14 日目からオーシストが脱落していく様子も観察された。 これらの結果は、Brca2 がスポロゾイトの分化に必須であり、Brca2 をノックアウトしたことでマラリア原虫の生活環がスポロゾイトに分化出来ないことで回転しなくなる事が示唆された。 (3) Brca2 の各ドメインの機能解析 マラリア原虫 Brca2 のクローニングを現在行っており、今後ノックアウト原虫や野生型原虫に導入することで、Brca2 タンパク質のどの領域が雌雄分化等に重要であるのか解析する予定である。
研究成果の 発 表	なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 3 日

採択番号	2021-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	福本 晋也
研究課題名	雄ハマダラカ-マラリア原虫易感染モデルによるベクターコンピテンシー制御機構の解明		
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 後井 宏実	北里大学獣医学部・准教授	
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	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	ハマダラカがマラリア原虫の感染を受けるオーカイネートからオーシスト形成期は原虫数が最も減少し、原虫感染に対して最も重要な防御免疫応答を起こす時期である。 様々な節足動物において、病原微生物に対する感受性雌雄差が報告されている。申請者はハマダラカにもマラリア原虫感受性の雌雄差があるとの仮説を立て、その立証を試みた。オーカイネートのマイクロインジェクションにより、本来吸血をしない雄に対しマラリア原虫を感染させることに成功した。次にオーシスト数を指標として雌雄ハマダラカのマラリア原虫感染表現型を解析した。その結果、雄ハマダラカが雌と比較し、高いマラリア原虫感受性を持つことを明らかにした。 以上の結果を踏まえ、本研究では原虫感染時の雌雄ハマダラカ遺伝子シグナル応答を比較解析し、マラリア原虫の感受性を規定する因子を同定、そのメカニズムを解明することを目的とする。		
研究経過の概要	マイクロインジェクション感染モデルにより、雄ハマダラカが雌と比較し高い感受性を示すこと、オーシストの形成部位に組織特異性が無いことが明らかになった。次に、オーカイネートインジェクション後、24・72 時間後の遺伝子発現を次世代シーケンサーによる RNA-Seq 法を用いて比較解析した。その結果、雌雄双方においてインジェクション後 24 時間で最も有意な遺伝子転写変動が認められた。さらに雄ハマダラカに培養した <i>P. falciparum</i> のガメートサイトおよびザイゴートをインジェクションし、<i>P. falciparum</i> の発育を確認した。 以上の結果を基盤として、ハマダラカのマラリア原虫ベクターコンピテンシー制御因子の同定を目指し、その分子メカニズムの解明を検討している。		

研究成果の概要	<i>P. berghei</i> のオーカイネートのインジェクションによるオーシスト形成数は注入したオーカイネート数(2000-5000/蚊)に関わらず雄で雌よりも多く形成され、感染率はともに 100% で差はなかった。オーカイネートのインジェクションによって分化したスポロゾイトは、雌雄蚊どちらの由来かに関わらず、3-6 日でマウスへの感染が確認され、オーカイネートのインジェクション感染により形成されたスポロゾイトに感染性があることが示された。 次に、雌雄 <i>A. stephensi</i> のオーシスト形成数に差を認めたため、原因遺伝子の探索を目的に RNA-seq を行った。まず雌雄蚊に 5000 オーカイネートまたは培養液のみをインジェクションし、オーカイネートが初期オーシストへと形態変化するインジェクション 24 時間後、およびオーシストへの形態変化が完了するインジェクション 72 時間後にそれぞれ蚊を採取して RNA-seq を行った。インジェクション 24 時間後において雄で遺伝子発現変動が 2 倍以上発現増加した遺伝子数は 140 個、発現減少したものは 89 個、雌では発現増加したものが 304 個、発現減少したものが 167 個であった。インジェクション 72 時間後では、雄で発現増加したものは 101 個、発現減少したものは 64 個、雌では発現増加したものは 141 個、発現減少したものは 114 個だった。 インジェクション 24・72 時間後において最も発現増加ならびに発現減少した上位 10 遺伝子をそれぞれみると、遺伝子機能が明らかとなっていないものが多くを占めていた。このことから、雌雄で変動の大きな遺伝子の多くが機能不明であることが示された。 雄 <i>A. stephensi</i> において <i>P. falciparum</i> のガメートサイトおよびザイゴートのインジェクション後 15 日目まで感染が確認された。さらに、ガメートサイトのインジェクション 1 日後と比べ 15 日後には <i>P. falciparum</i> の DNA 量が増加していた。これらのことから、雄 <i>A. stephensi</i> にガメートサイトまたはザイゴートのインジェクションにより形成されたオーシスト内でスポロゾイトが形成されている可能性が示された。 本年度は来所できながったが、Web およびメールでのディスカッションを実施し、旅費に関する経費を研究課題遂行に必要な、試薬および研究用消耗品の購入に変更した。
研究成果の発表	第 164 回日本獣医学会学術集会(2021 年 9 月) 雌雄ハマダラカにおける <i>Plasmodium berghei</i> 感受性の比較 原口 麻子、鈴木 こなつ、高野 真、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、吉川 泰永、草木迫 浩大、筏井 宏実 第 67 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会(2021 年 10 月) 雄ハマダラカを用いた <i>Plasmodium falciparum</i> oocyst 形成の検討 原口 麻子、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、草木迫 浩大、筏井 宏実 第 91 回日本寄生虫学会大会(2022 年 5 月) <i>Plasmodium</i> 原虫発育に対する雌雄ハマダラカの分子機構解析 原口 麻子、高野 真、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、吉川 泰永、草木迫 浩大、筏井 宏実

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 5 日

採択番号	2021-共同-16		
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	菅沼 啓輔
研究課題名	Deciphering trypanosome parasite tissue tropism and sequestration		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Jack Sunter	Oxford Brookes University, David Fell Research Fellow	
研究分担者			
	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・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	アフリカ動物トリパノソーマ症病原原虫の中でもっとも病原性が高く、かつ他種アフリカトリパノソーマに比べて研究が進展していない <i>Trypanosoma congolense</i> を対象として、遺伝子組換えトリパノソーマの哺乳類およびベクター組織移行動態の解析を目的とする。本研究では <i>T. congolense</i> の全ステージ培養系を有する原虫研先端予防治療学分野に、研究代表者が遺伝子組換え原トリパノソーマ作製用プラスミドの構築と提供を行う。研究分担者は分与プラスミドをもちいた遺伝子組換え <i>T. congolense</i> の樹立を目指す。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開および遺伝子組換えトリパノソーマ作製用プラスミド提供後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者は培養トリパノソーマの維持に努めた。		
研究成果の概要	<i>T. congolense</i> での遺伝子組換えトリパノソーマの作製を目指して、解析候補遺伝子を検討した。結果、同原虫で特異的に発現する数種類の遺伝子を特定することが出来た。さらに、申請者のラボで標的遺伝子に対するプラスミドコンストラクトを設計・構築済みであり、今後共同研究者への送付を予定している。		
研究成果の発表	特になし。		

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-17		
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	Development of antigen detection rapid diagnostics for equine piroplasmosis		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	サンジャイ クマール Sanjay Kumar	ICAR-National Research Centre on Equines Principal Scientist	
研究分担者	ラジェンダ クマール Rajender Kumar	ICAR-National Research Centre on Equines Principal Scientist	
	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	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<i>Theileria equi</i> と <i>Babesia caballi</i> の感染によって引き起こされる馬ピロプラズマ病は世界で深刻な問題となっている。そこで、その急性感染を現場で迅速に診断できる“抗原検出用馬ピロプラズマ感染診断システム”を開発する。本システムを開発できれば、馬の国際移動時の感染馬の摘発や臨床現場での迅速な治療が可能となる。		
研究経過の概要	馬ピロプラズマ病 (EP) は、馬、ロバ、シマウマ、ラバなどのウマ科動物が <i>Theileria equi</i> と <i>Babesia caballi</i> の感染によって引き起こされるマダニ媒介性疾患である。その EP は世界的に流行しており馬産業に多大な経済的被害を及ぼしている。特に、感染した動物はキャリアーとなり媒介マダニの感染源となることから疾病管理上の大きな課題となっている。インドの隣国であるスリランカ国の家畜動物の間では様々なマダニ媒介病原体による感染症が知られているが、<i>T. equi</i> と <i>B. caballi</i> による感染実態はスリランカでは未解明のままであった。そこで、見かけ上健康な放し飼いロバを対象に、<i>T. equi</i> と <i>B. caballi</i> を検出する遺伝子診断法を用いて感染疫学調査を実施した。		

研究成果の概要	スリランカの Mannar 地区 (n = 100) と Kilinochchi 地区 (n = 11) のロバ計 111 頭から血液サンプルを採取した。まず血液サンプルから血液塗抹標本を作製し、顕微鏡検査を行った。次に血液から DNA を採取し、種特異的 PCR 法を用いて <i>T. equi</i> および <i>B. caballi</i> 感染のスクリーニング診断を行った。その結果、64 頭 (57.7%) および 95 頭 (85.6%) のロバが、それぞれ顕微鏡検査および PCR 検査により <i>T. equi</i> に陽性を示した。一方で <i>B. caballi</i> はすべての検体で陰性であった。また <i>T. equi</i> の 18S rRNA 配列の系統解析から、C と D の 2 つの異なる遺伝子型が検出された。これらの成果は、スリランカ国で減少しているロバの <i>T. equi</i> による EP のモニタリングの重要性を明らかにするものとなった。
研究成果の発表	Believe Ahedor, Hemal Kothalawala, Ratnam Kanagaratnam, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Davaajav Otgonsuren, Bumduuren Tuvshintulga, Enkhbaatar Batmagnai, Seekkuge Susil Priyantha Silva, Thillaiampalam Sivakumar, Naoaki Yokoyama: First detection of <i>Theileria equi</i> in free-roaming donkeys (<i>Equus africanus asinus</i>) in Sri Lanka. Infection, Genetics and Evolution. 2022 Feb 9; 99: 105244. PMID: 35149223.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 23, 2022
Project no: 2021-joint-18

1. Principal investigator

Name: RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.

Position: Research Scientist – Laboratory of Molecular Biology of Ticks (previously Laboratory of Vector Immunology)

Affiliation: Institute of Parasitology, Biology Centre CAS, Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic, Europe

2. Project title:

The development of a DiCre recombinase-expressing strain of *Babesia* for the creation of conditional gene knockouts.

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Prof. Shin-Ichiro Kawazu and Dr. Masahito Asada

Position:

4. Research period (in mm/dd/yyyy, and total number of years)

01/04/2021 -31/03/2022

1 year

5. Purposes and objectives

The major objective of this project is the development of novel functional genomic tools for tick-borne *Babesia* parasites, namely the creation of a stable transgenic DiCre recombinase-expressing strain(s) of *Babesia*. DiCre conditional recombinase system enables functional analysis of indispensable parasite genes where conventional non-inducible knock-out systems cannot be used. This technique has been previously applied to Apicomplexa model species *Toxoplasma gondii* and *P. falciparum* but *Babesia* recombinase-expressing strain has not yet been introduced.

The individual objectives of this project include (i) the design and cloning of *Babesia* plasmid constructs allowing for the integration of both Cre subunits into the same genomic locus of selected *Babesia* species, (ii) generation of “parental” DiCre parasite line(s) incl. optimization of transfection strategy for *Babesia*, (iii) implementation of the loxP sites into the parasite via the both episomal and intra-genomic approaches to verify recombinase activity, and (iv) performance of conditional knock-out(s) of selected *Babesia* target genes.

6. Outline of research process

no progress (no visit) due to COVID-19 related restrictions in 2021

7. Outline of research achievements

no progress (no visit) due to COVID-19 related restrictions in 2021

8. Publication of research achievements

no progress (no visit) due to COVID-19 related restrictions in 2021

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-19		
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	Isolation and <i>In vitro</i> cultivation of <i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>Babesia</i> sp. Mymensingh, and <i>Babesia</i> sp. Hue-1 from cattle in Vietnam		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ブン タン ロン Phung Thang Long	Hue University of Agriculture and Forestry Associate Professor	
研究分担者	ディン チ ビッチ ラン Dinh Thi Bich Lan	Hue University of Agriculture and Forestry Associate Professor (Visiting)	
	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	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	牛バベシア病は世界で広く発生が認められ、ベトナム国にはその原因原虫である 4 種類の牛バベシア (<i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>Babesia</i> sp. Mymensingh, and <i>Babesia</i> sp. Hue-1) の分布が明らかとなっている。そこで本研究では、それら牛バベシアのベトナム由来分離培養株を樹立することを目的とした。分離培養株が樹立できれば、各種牛バベシア病の診断、治療、及び予防に関する技術開発や、それぞれの病態の解明が飛躍的に加速することが期待される。		
研究経過の概要	牛バベシアによって引き起こされる牛バベシア病は、畜産業に多大な経済的損失を与えている。牛バベシアは水牛などの牛以外の宿主からも頻繁に検出されており、そこからマダニによって牛に伝播する可能性が危惧されている。そのため、牛だけでなく牛以外の宿主における牛バベシアの感染も監視する必要がある。そこで、モンゴル国のラクダを対象に、モンゴルの牛から過去に検出された臨床学的に重要な 3 種の牛バベシア (<i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i> , および <i>Babesia</i> sp. Mymensingh) の感染について疫学調査を行った。		

研究成果の概要	モンゴル国内の 6 県のラクダ計 305 頭から採取した血液 DNA サンプルについて、原虫特異的 PCR 法を用いてスクリーニング調査を行った。その結果、モンゴル国のラクダは、調査した 3 種すべての牛バベシアに感染していることが判明した。<i>B. bovis</i>、<i>B. bigemina</i>、および <i>Babesia</i> sp. Mymensingh の全体陽性率はそれぞれ 32.1%、21.6%、24.3%であり、調査対象動物の 52.5%が少なくとも 1 種の牛バベシアに感染している実態が明らかとなった。モンゴル国では通常牛とラクダが放牧地を共有しており、さらに牛に寄生するマダニ種はラクダにも寄生する。これらの背景から、牛とラクダの間でマダニを介した牛バベシアの伝播が起こっている可能性が示唆された。したがって、モンゴル国における牛バベシア病の防除戦略には、ラクダにおける牛バベシア感染の対策を含める必要がある。
研究成果の発表	Davaajav Otgonsuren, Thillaiampalam Sivakumar, Tovuu Amgalanbaatar, Batsaikhan Enkhthaivan, Sandagdorj Narantsatsral, Batdorj Davaasuren, Myagmar Zoljargal, Dalantai Munkhgerel, Batbold Davkharbayar, Enkhbaatar Batmagnai, Bumduuren Tuvshintulga, Believe Ahedor, Punsantsogvoo Myagmarsuren, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, <u>Naoaki Yokoyama</u>: Molecular survey of bovine <i>Babesia</i> species in Bactrian camels (<i>Camelus bactrianus</i>) in Mongolia. Ticks and Tick-borne Diseases. 2022 Jan; 13(1): 101871. PMID: 34814064.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 5 日

採択番号	2021・共同・20		
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	菅沼 啓輔
研究課題名	Investigation on the presence of trypanocidal drug resistance used for water buffaloes in the Philippines		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Marvin Villanueva	Philippine Carabao Center, Senior Science Research Specialist	
研究分担者	Claro Mingala	Philippine Carabao Center, Scientist III	
	Gabriel Alexis Tubalinal	Livestock Biotechnology Center, Science Research Specialist II	
	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・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	フィリピン国内の家畜において、 <i>Trypanosoma evansi</i> 感染症(スーラ病)のアウトブレイクが多数報告され、家畜生産性を低下させる大きな要因となっている。そのため、スーラ病のコントロールはフィリピンにおける畜産業振興のために喫緊の課題となっている。薬剤投与による効率的なスーラ病制御のためには、対象となる地域で流行している <i>T. evansi</i> 株の薬剤感受性の解析が必須である。本研究課題では研究分担者の構築した薬剤感受性解析系を研究代表者の研究室に技術移転させることを目的とした。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者は薬剤感受性試験を技術移転するためにトリパノソーマの培養維持に努めた。またフィリピン国から入手したサンプルを用いてトリパノソーマ症感染にかかるリスク因子を探索した。		
研究成果の概要	関連研究の成果として、フィリピンにおけるスイギュウ、山羊およびウシにおける <i>T. evansi</i> の感染状況についての疫学情報を収集した。結果、ボホール島のフィリピンカラバオセンターおよびその周囲で使用されている各種家畜の血液サンプルから <i>T. evansi</i> および <i>T. (Megatrypanum) theileri</i> の遺伝子を検出した。また、これらのトリパノソーマを媒介する吸血性節足動物が多く発生されると推測される雨季に感染率が有意に上昇することから、とくにその時期に薬剤投与などの対策が必要であることが明らかとなった。		
研究成果の発表	Elata A., et al., Molecular detection of animal trypanosomes in different animal species in the Visayas region of the Philippines(論文投稿中)		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022 年 6 月 5 日

採択番号	2021-共同-21		
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	菅沼 啓輔
研究課題名	I International collaborative research on the diagnosis of Dourine between the NRCPD and HVRI OIE reference laboratories		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	Zhe Hu	Harbin Veterinary Research Institute, CAAS	
研究分担者	Cheng Du	Harbin Veterinary Research Institute, CAAS	
	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・先端予防治療学分野・助教	
研究期間	2021 年 4 月 1 日 ～ 2022 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	ウマ伝染性貧血の OIE リファレンスラボラトリー (Harbin Veterinary Research Institute) であり、ウマの感染症を多数研究している申請者の研究室へ、共同研究者の研究室で確立した梅毒トリパノソーマ分離・培養技術およびトリパノソーマ症診断技術を移転することを目的とした共同研究を展開する。さらに移転された技術を用いて、中国におけるウマトリパノソーマ症の疫学調査を行うことを目的とした。		
研究経過の概要	COVID-19 の蔓延により研究代表者の研究活動が困難であった。研究代表者の研究再開後のすみやかな実験開始にそなえ、研究分担者は web での梅毒トリパノソーマ分離・培養技術の指導と、診断用抗原および標準 DNA の材料となるトリパノソーマの培養維持を行った。		
研究成果の概要	関連研究の成果として、ウマトリパノソーマ症の流行状況の把握および感染リスク解析を目的として、パラグアイにおけるウマトリパノソーマ症の疫学調査を実施した。ここで得られた成果を、今後の共同研究事業において活用する。		
研究成果の発表	Suganuma et al., First molecular survey of animal trypanosomes in Paraguayan horses, Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports, 2022, 27, 100664 Yamazaki et al., Risk factors for equine trypanosomosis and hematological analysis of horses in Paraguay, Acta Tropica, 2022, 233, 106543		