

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月6日

採択番号	2022-共同-7		
研究部門	国際連携協力部門	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	ヒト赤血球馴化 <i>Babesia microti</i> の作出と宿主域決定因子の解析		
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 (役割分担) 変異原虫のゲノム、トランスクリプトーム解析	
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 (役割分担) パベシア原虫の非固有宿主への馴化	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p><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。しかしながら、ヒト赤血球を用いた <i>in vitro</i> 培養系がないため、ヒトにおける感染性と病原性に関与する分子メカニズムの解明は進んでいない。そこで、赤血球の一部をヒト赤血球に置換した SCID-Bo-RBC マウスを用いたヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出について、昨年度の原虫病研究センター共同研究から継続して実施している。本年度は、条件の最適化を進めると共に、馴化に成功した場合は、馴化に関わるゲノムおよびトランスクリプトーム変異の特定を試みる。また、馴化がうまくいかない場合に備え、既に馴化に成功している <i>B. bovis</i> について、宿主域拡大に関わる原因遺伝子の特定と機能解析、および、当該遺伝子発現亢進に関与することが考えられるメタゲノム解析をおこない、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> 導出の参考とする。</p>		
研究経過の概要	<p><i>B. microti</i> のヒト赤血球馴化について、SCID マウスにて増殖・調整した Peabody 株を、DNA 変異導入剤で処理した後、マウス赤血球の大半をヒト赤血球に置換した SCID-Hu-RBC マウスに接種した。接種 11 日後にパラシテミアの上昇が確認されたが、ヒト赤血球はほとんど見当たらず、ヒト赤血球馴化 <i>B. microti</i> の作出には至らなかった。</p> <p>昨年度の共同研究で、ヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> で、メロゾイト表面抗原分子 (MSA2a) の転写が特異的に亢進することを見出した。そこで、この遺伝子を過発現させることで、ヒト赤血球感染能を獲得できるか検証する目的で、組換え原虫を作成し、アピカルエンドへの局在を確認した。今後、ヒト赤血球への感染性の有無を確認する。</p> <p>MSA2a に代表される遺伝子発現変動の原因として、ゲノム DNA 変異が疑われたが、全ゲノム解析により、馴化株と親株のゲノムが同一であることが示された。そこで、DNA メチル化に着目し、nanopore シーケンサーにより解析したところ、馴化株では、5mC の割</p>		

	<p>合が減少する一方、5hmC の割合が増加していた。確認のため、バイサルファイト法で追試したが、本法ではメチル化は認められず、矛盾した結果となった。今後、ヒストンアセチル化の解析と、未知の DNA 修飾が介在する可能性について検討する。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>① SCID-Hu-RBC マウスを用いたヒト赤血球馴化</p> <p>摘脾した SCID マウスを用意し、ヒト赤血球を隔日で腹腔内投与することにより、マウス赤血球の大半をヒト赤血球に置換した SCID-Hu-RBC マウスを作製した。同時に <i>B. microti</i> Peabody 株を SCID マウスに接種し、パラシテミアが約 15% になった所で心採血を行い、ゲノムに変異を導入するため N-ニトロソ-N-エチル尿素 (NEU) 2mM 入り GIT 培地にて 8 時間培養を行った。NEU 処理群並びにコントロールとして培地のみで培養した未処理群をそれぞれ 2 頭の SCID-Hu-RBC マウスに接種した。原虫接種 11 日後にパラシテミアの上昇が確認されたため、血液塗抹標本を作製し、抗マウス赤血球抗体を用いた間接蛍光抗体法にてマウス赤血球を染色し、ヒト赤血球に寄生する <i>B. microti</i> を探したが、ヒト赤血球がほとんど見当たらず、ヒト赤血球に馴化した <i>B. microti</i> は観察されなかった (図 1)。本実験は更なる条件検討が必要と考えられる。</p> <p>② <i>B. bovis</i> のヒト赤血球馴化に関わる遺伝子の機能解析</p> <p>昨年度の共同研究で作製したヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> を用いたゲノム・トランスクリプトーム解析から、バベシア原虫のヒト赤血球馴化に関わる候補分子が 2 種類同定されたため、その内の 1 つ (MSA2a:メロゾイト表面抗原分子の 1 種) について解析を進めた。本分子は MSA ファミリーの 1 つであり、ヒト赤血球馴化株において mRNA 発現量の亢進が見られたが、詳しい機能解析は行われていなかった。そこで、Myc タグ配列を付加した本分子を過発現する組換え <i>B. bovis</i> を作出した。得られた組換え原虫に対し、抗 Myc 抗体を用いた間接蛍光抗体法を行ったところ、原虫のアピカルエンドに局在が観察され、過発現が確認されると共に、アピカルエンドのオルガネラからメロゾイト表面に分泌される分子であることが示唆された (図 2)。今後過発現原虫において、ヒト赤血球への侵入・発育能向上が見られるか解析を進める予定である。</p> <p>③ <i>B. bovis</i> のヒト赤血球馴化に関わるエピゲノム制御の解析</p> <p>昨年度の共同研究では、導出したヒト赤血球馴化 <i>B. bovis</i> のゲノムが親株と同一であることを全ゲノム解析により明らかとした。一方、トランスクリプトームには差異が認められたため、馴化にはゲノム変異によらない遺伝子発現制御、すなわち、エピゲノムの関与が示唆された。そこで、nanopore シーケンサーがメチル化修飾の有無も判定できることに着目し解析を行ったところ、馴化株では、5mC の割合が減少する一方、5hmC の割合が増加しており、メチル化修飾の転写制御への関与が疑われた。そこで、バイサルファイト法でメチル化修飾の確認を試みたが、本法ではメチル化は認められず、矛盾した結果となった。今後、ヒストンアセチル化の解析と、未知の DNA 修飾が介在する可能性について検討する。</p> <p>上記の結果をふまえ、今後の SCID-Hu-RBC マウスを用いたヒト赤血球馴化については、馴化に長期間を要する可能性を想定し、<i>B. microti</i> 感染後、継続してヒト赤血球を追加する系を検討する他、DNA に変異を誘導するのではなく、ヒストン脱アセチル化阻害剤の添加によりエピジェネティクス制御を攪乱することで、馴化の可能性を高めることが可能か検討する。</p>

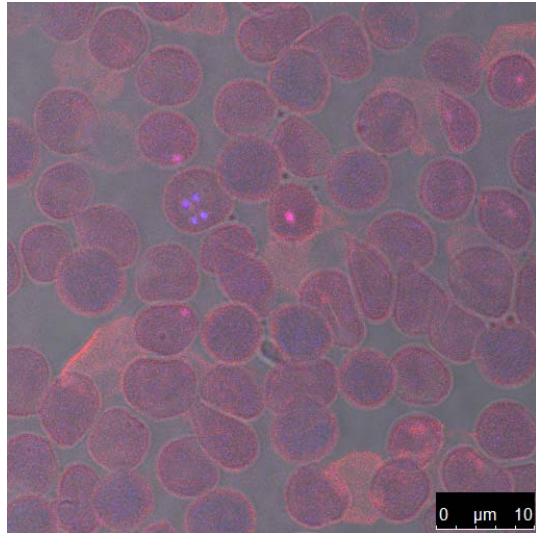


図 1. *B. microti* 感染 SCID-HuRBC マウス

赤色蛍光:マウス赤血球を示す。青色蛍光:*B. microti* の核が染色されている。*B. microti* の増殖が見られた時点でヒト赤血球はほとんど消失していた。

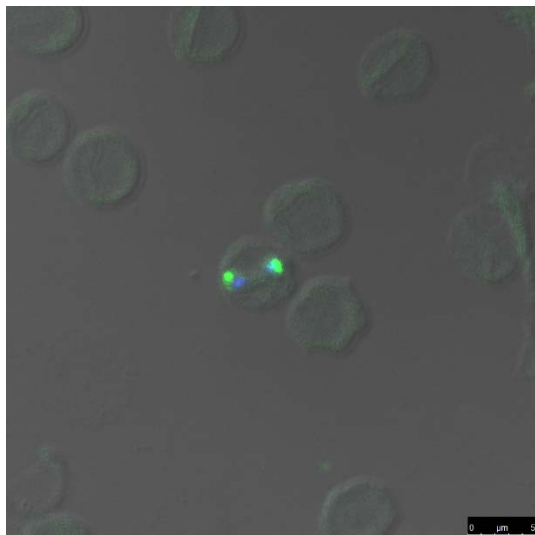


図 2. MSA2a の局在観察。緑色蛍光:Myc タグ付加した MSA2a。青色蛍光:核染色。アピカルエンドに局在していることがわかる。

研究成果の
発表

特記事項なし。