

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

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-1		
研究部門	創薬研究部門	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	トキソプラズマ感染における頭頸部感覚器フェロトーシスの研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	かねこ ひろき 兼子 裕規	名古屋大学医学部医学系研究科・准教授	
研究分担者	しみず ひでゆき 清水 英幸	名古屋大学医学部附属病院眼科・病院助教	
	たざき あきら 田崎 啓	名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学・講師	
	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	2022年4月1日～2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>申請者は現在、細胞死の新概念であるフェロトーシスの中枢神経・頭頸部感覚器における重要性を「網膜フェロトーシス」という新概念を提唱することで研究報告しており、その一環として、寄生虫眼感染を主軸として網膜細胞死におけるフェロトーシスの関与を科学的に証明することに挑戦している。本研究では、『眼内液中 Fe 濃度の低下』の背景にある『網膜フェロトーシス』という生物学的変化をヒト・実験動物・培養細胞で証明し、フェロトーシスを制御することによる頭頸部感覚器障害の抑制に挑戦する。</p>		
研究経過の概要	<p>研究は順調に進められ、論文発表に必要な実験計画の半分以上は順調に揃っている。また競争的研究費獲得として科研費基盤 C を獲得した。</p> <p>研究課題: 寄生虫感染とシリコンオイル使用眼で観察される網膜障害の原因はフェロトーシスか？</p> <p>研究代表者: 兼子裕規 研究分担者: 西川義文ほか2名 研究期間: 2022/04/01 – 2025/03/31</p> <p>AMED: 国立研究開発法人日本医療研究開発機構「新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業」は 2023 年度不採択となったが、2024 年度に再度申請する。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>これまでに以下の内容について研究成果を得ており、今後追加実験を行い論文発表する。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・トキソプラズマ感染ヒト硝子体液中の Fe 濃度低下に対し、ウイルス性網膜炎のヒト硝子体液中では Fe 濃度は低下していなかった。 ・数十年前に摘出されたヒト眼球から得られた網膜切片から Berlin Blue 染色・レーザアブレーション ICP 質量分析 (LA-ICP-MS) 法で Fe が検出された。 ・トキソプラズマ感染マウスに安定同位体 Fe57(自然界に存在する Fe の 90%は Fe56 であるのに対し Fe57 は 2%しか存在しないため、体外から投与するとトレーサーとして動態解析できる)を投与し、そのマウス網膜切片から LA-ICP-MS 法での Fe57 が有意に多く検出された。 ・ Fe キレート剤をトキソプラズマ感染マウスに投与したところ、トキソプラズマ網脈絡膜炎が軽減された。
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>研究論文は特許出願完了の後に投稿する方針で進めてきており、現在投稿に向けて準備している。</p> <p>投稿予定 Journal: Redox Biology</p> <p>論文発表に先立って特許出願は完了した。</p> <p>特願 2022-178619</p> <p>【発明の名称】微生物性眼疾患の検査技術、微生物性眼疾患治療薬</p> <p>出願者: 兼子裕規・西川義文ほか2名</p> <p>施設: 名古屋大学・帯広畜産大学</p>

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7日

採択番号	2022-共同-2		
研究部門	創薬研究部門	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	妊娠期のトキソプラズマ感染防御における $\gamma\delta T$ 細胞の役割の解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	はせ こうじ 長谷 耕二	慶應義塾大学薬学部生化学講座・教授	
研究分担者	すずき こういちろう 鈴木 功一郎	慶應義塾大学薬学部生化学講座・特任助教	
	きなし ゆうすけ 木梨 祐輔	慶應義塾大学薬学研究科生化学講座・博士課程大学院生	
	とりうみ ひろき 鳥海 広暉	慶應義塾大学薬学研究科生化学講座・修士課程大学院生	
	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>母体-胎児のインターフェース(母子境界面)に存在する子宮免疫系は、外来微生物に対する生体防御を発動する一方で、胎児に対しては免疫寛容を発動するよう厳密に調節されている。子宮免疫系の特徴として、T細胞の大部分を特殊なT細胞サブセットである $\gamma\delta T$ 細胞が占めることが挙げられるが、その生理的意義については不明である。そこで、妊婦への感染によって垂直感染を引き起こすトキソプラズマ感染実験を共同研究として実施することで、妊娠時感染防御における $\gamma\delta T$ 細胞の重要性を検証する。</p>		
研究経過の概要	<p>これまでに、$\gamma\delta T$ 細胞を欠損する <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスを用いて、妊娠時の感染実験4回(3回は出産時の表現型を観察、1回はメカニズム解析のため出産直前に剖検)に加え、非妊娠時に感染させる実験も実施している。妊娠時に感染させる実験では毎回 <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスが出産中に死亡するという再現性の高い結果が得られており、メカニズムの解析に着手している。</p> <p>以上の研究により、母子境界面 $\gamma\delta T$ 細胞の重要性を示唆する結果が得られており、研究は概ね順調に進捗している。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>妊娠時感染防御における $\gamma\delta T$ 細胞の役割を調べるために、野生型および <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスをそれぞれ交配しプラグが確認された個体に、<i>Toxoplasma gondii</i> を感染させた。その結果、野生型マウスと <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスで <i>T. gondii</i> 感染後の臨床スコアには有意な差は認められなかった。しかし、全ての野生型マウスが全胎児を分娩しその後も生存したのに対して、<i>Tcrd</i>^{-/-}マウスでは約 3 割の個体が難産により出産中に死亡した。この時 <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスの子宮では胎盤遺残が認められた。また、母親と出生後の子の脳内の <i>T. gondii</i> を定量したところ、母親の脳では野生型マウスと <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスで差がなかったのに対して、子の脳の <i>T. gondii</i> は <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスで多い傾向にあった。</p> <p>一方、非妊娠下で <i>T. gondii</i> を感染させた場合は、雌雄ともに、野生型マウスと比べて <i>Tcrd</i>^{-/-}マウスでは臨床スコアが低い傾向にあった。</p> <p>以上の結果より、子宮や脱落膜に存在する $\gamma\delta T$ 細胞が母子境界面局所におけるトキソプラズマの排除や組織修復に関与しており、妊娠中のトキソプラズマ感染から母子を保護している可能性が示唆された。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>2022 年度帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究成果報告会にて発表</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

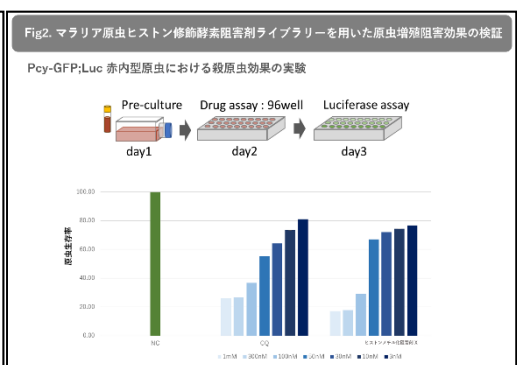
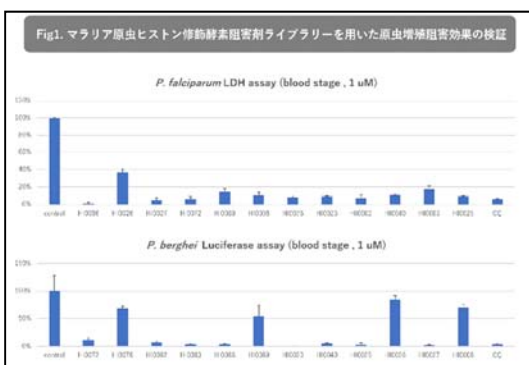
2023年5月30日

採択番号	2022-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	ヒストン制御機構に着目した新規抗マalaria化合物のスクリーニングと原虫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	
	あらか 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 覚	獨協医科大学 熱帯病寄生虫病学・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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>本研究では、新規抗マalaria化合物のスクリーニングのためにヒストン制御機構に着目し、原虫の肝内型ステージの休眠期と増殖期におけるメカニズムの解明と、それらを用いた際の原虫オルガネラの三次元構造解析を実施する。申請者らが既に作製に成功した可視化サルマalaria原虫 <i>Plasmodium cynomolgi</i> (Pcy-GFP;Luc)株と可視化ネズミマalaria原虫 <i>P.berghei</i> (Pb-GFP;Luc)株を使用し、培養肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 感染実験系によりルシフェラーゼアッセイを用いた薬物感受性試験を行う。また、化合物における原虫の増殖機構への影響を詳細に評価するために、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、化合物環境下の原虫オルガネラの三次元構造解析を試みる。</p>		
研究経過の概要	<p>新型コロナウイルス感染症の影響で実験用アカゲザルの搬入が遅れ、当初の予定より実験の進行が遅れた。2023年3月現在アカゲザルへの感染実験を遂行中であり、肝内型原虫における化合物ライブラリーを用いたスクリーニング実験を随時実施する予定である。そのため、本年度は関連実験として <i>in vitro</i> 培養系で維持が可能な <i>P.berghei</i>と <i>P.falciparum</i>を用いた赤内型におけるスクリーニング実験を実施した。実験に使用したライブラリーは、セレックバイオテック社より選定したで原虫ヒストン修飾酵素阻害化合物全200種類である。結果、<i>P.falciparum</i>では、200化合物中34化合物で既存の薬と同程度または、それ以上の効果を示すものが明らかとなった。また、<i>P.falciparum</i>において非常に原虫阻害効果の高かった化合物13種類を用いて <i>P.berghei</i>への増殖阻害効果を確認したところ、驚いたことに原虫阻害効果が殆どない化合物も認められた(Fig1)。本実験により、原虫種によって各々のヒストン修飾酵素は、異なる働きを持つことが示唆された。</p>		

研究成果の概要

更に我々は、*P. cynomolgi* に関しても赤内型におけるスクリーニング実験に向けた *in vitro* 培養系を構築した。これまで、*P. cynomolgi* (B株) においては、赤内型の *in vitro* 培養系が存在せず、薬剤スクリーニング実験の実施が非常に困難であった。そこで、今回我々の作製した luciferase 発現株 Pcy-GFP;Luc 株を使用して構築した短時間培養系から、*P. cynomolgi* の薬剤感受性の実験の樹立に成功した。原虫の増殖の阻害効果の指標には、luciferase signal を用いて、luciferase assay による測定を行った。この実験系から本実験では、既存の抗マalaria薬である CQ (chloroquine) とヒストンメチル化酵素阻害剤 X を用いて *P. cynomolgi* の原虫増殖阻害効果を確認した。結果、CQ においてもヒストンメチル化酵素阻害剤 X においても非常に低濃度で原虫を殺滅することが明らかとなった。

また、肝内型原虫においても *P. berghei* を使用して同阻害化合物ライブラリーを用いたスクリーニング実験を開始しており、非常に興味深いデータを得ている。*P. cynomolgi* に関しても、スポロゾイトの調整が完了次第随時、肝内型原虫における本ライブラリーを用いたスクリーニング実験を開始する予定である。今後、本研究の遂行により、休眠期原虫の再活性化機序の分子トリガーが明らかとなれば、殺原虫活性を有する新たな化合物スクリーニングを実地できる可能性があり、マalariaの創薬科学に大きく貢献することが出来る。



研究成果の発表

学会発表

1. 荒木球沙、川合覚、角田宗一郎、梅木優子、立石祐樹、中野由美子、岡本宗裕、保富康宏、久枝一、案浦健「可視化マalaria原虫を用いた休眠・増殖の分子機構と創薬基盤の構築」帯広畜産大学原虫病研究センター2022 年度共同研究報告会(帯広:2023 年 3 月)
2. 荒木球沙、川合覚、梅木優子、立石祐樹、中野由美子、岡本宗裕、保富康宏、久枝一、案浦健「マalaria原虫・肝臓内休眠体ステージの解析を目的とした可視化原虫株の開発(1)～可視化原虫株の作製、全発育期における確認、*in vitro* 解析、創薬開発への発展性～」第 92 回日本寄生虫学会大会(金沢:2023 年 3 月)
3. 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「電子顕微鏡を用いたマalaria原虫オルガネラの三次元構造解析」第 28 回分子寄生虫ワークショップ/第 18 回分子寄生虫マalaria研究フォーラム合同大会

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月31日

採択番号	2022-共同-4		
研究部門	創薬研究部門	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>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。潜伏感染の成立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、潜伏感染を制御する手法につながる。R3年度までにゲノム編集後の継代期間を最小限にして変異原虫の混合ポピュレーションを効率的に樹立する方法を確立し、NGSを用いたポピュレーション解析の感度を感染臓器中の原虫材料に適用可能なレベルまで向上させた。R4年度はマウス感染モデルにおける各感染時期、感染臓器ごとの変異原虫ポピュレーションを追跡し、原虫因子機能の時空間的な解析技術の構築を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p><u>①NGSによるポピュレーション追跡手法の実践</u> 遺伝子変異を保有する原虫と野生型の原虫集団が潜伏感染期のマウス脳でどのように集団構成を変化させるかをR3年度に引き続き感染マウスの個体数を増やして実施した。感染期間に依存した変化より感染マウスごとの差が大きく、脳に到達する原虫集団は厳しいボトルネックを経験していることが判明し、ポピュレーション追跡を潜伏感染解析に用いる際の課題を明確にした。</p> <p><u>②NGSによるポピュレーション追跡手法の改良</u> 潜伏感染のみで機能する原虫因子について本手法での解析が不向きであることが①でしめされたことから、解析の焦点を急性期と潜伏期のいずれでも影響の出る因子 <i>myr1</i>へ変更した。また、既存のKO株に適用可能とするため、病原性に影響のない <i>uprt</i> 遺伝子にバーコードを埋め込み、感染マウス個体内で詳細な原虫動態を追跡可能とした。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>① <u>NGSによるポピュレーション追跡手法の実践</u></p> <p>急性感染期におけるポピュレーション追跡 親株と TgGP 変異原虫を混合して感染させたマウスから回収した臓器(心、肝、肺、腎)で PCR により変異アリルを増幅し、上記 2 株の割合の増減を観察した。本実験では潜伏感染を成立させるために原虫投与量を少なく設定している。そのため急性期における臓器中の原虫数も少なく、PCR のバイアスは避けられないものの、各臓器から抽出した DNA では上記 2 株の割合は同程度に検出されたため、急性感染期において本遺伝子の変異が影響ないという従来の報告と一致する結果を得た。</p> <p>潜伏感染期におけるポピュレーション追跡 R3 年度に実施していた潜伏感染期における 2 株の割合変動について、マウス個体数を増やして解析した。感染マウス個体ごとのばらつきは再現性がとれ、潜伏感染を成立させた原虫には強いボトルネック効果がかかっていることが改めて確認された。この傾向は 2022 年に Child 等のグループから報告された 96 種類のバーコードを付けた野生株原虫の <i>in vivo</i> での動態解析における潜伏感染移行の際のボトルネック効果と一致しており、ポピュレーション追跡手法を潜伏感染の評価に用いるために解決すべき課題であることが示唆された。</p> <p>② <u>NGSによるポピュレーション追跡手法の改良</u></p> <p>解析の焦点を潜伏期においてシスト形成が全くない、かつ、急性期での宿主体内増殖にも影響が見られる遺伝子にシフトし、急性期のどの段階で影響があり結果的に潜伏感染に至らないのかを解析する手法の開発を目指した。</p> <p>モデル遺伝子として IFN-gamma による抗原虫効果を阻止するエフェクター群の分泌を司る <i>myr1</i> 遺伝子を選択した。<i>myr1</i> の KO および HA タグ付き <i>myr1</i> で相補した株を作成した。KO 株と相補株を混合したポピュレーションを詳細に追跡可能とするため、R3 年度に構築した迅速バーコード技術を用いて、<i>in vivo</i> での増殖に影響がない <i>uprt</i> 遺伝子座にそれぞれの細胞を識別するための 10 塩基のインデックスを挿入した。導入されたインデックスの多様性は、すべての実験群において 10^6 程度の原虫に対して 5000 を超えており、<i>in vivo</i> において混合集団内のポピュレーション変動を超並列に実施可能となる。今後はこの技術でバーコードを付けた原虫集団を混合してマウスに感染させ、急性感染期から脳に到達して潜伏感染を成立させる段階のどこで <i>myr1</i> ノックアウト原虫の割合が変動するかを解析していく。</p>
<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

2023年6月3日

採択番号	2022-共同-5		
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	熱帯熱マalaria原虫ガメトサイトの細胞接着に必要な表層分子の同定		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	みやざき しんや 宮崎 真也	長崎大学熱帯医学研究所細胞環境構築学分野・助教 実験の実施、研究の総括	
研究分担者	Blandine Franke- Fayard	Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, The Netherlands. Assistant Professor 熱帯熱マalaria原虫の遺伝子改変・細胞接着に関する技術提供	
	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) 考察、マalaria原虫の細胞接着に関する技術提供	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>本研究の目的は、熱帯熱マalaria原虫のガメトサイトがヒト骨髄の中に潜伏するために必要な原虫分子を同定することである。マalariaは熱帯地域で蚊により媒介され、甚大な数の感染者・死者を出す原虫感染症である。その病原体である熱帯熱マalaria原虫は、ヒト赤血球内で増殖する一方で、一部の原虫はガメトサイトと呼ばれる形態へと分化しヒトから蚊へと伝播する。熱帯熱マalaria原虫が赤血球内で増える際には、その感染赤血球は末梢の血管系の中に滞留するが、ガメトサイト感染赤血球は骨髄の中の微小環境に潜伏する。この潜伏過程では、ガメトサイト感染赤血球の表面に発現する表層分子を介した骨髄中の間葉系細胞への接着が起こると考えられている。しかしながら、骨髄中の細胞への接着に関与する原虫分子の実体は未同定である。この不明点を明らかにするために、遺伝子ノックダウンの手法と骨髄間葉系幹細胞の系を用いて、ガメトサイト期の細胞接着に必要な原虫分子を同定する。本研究によりガメトサイトの骨髄潜伏の分子基盤が明らかになり、ガメトサイト生物学・抗マalaria薬開発における新機軸が打ち出される。</p>		
研究経過の概要	<p>本研究計画では熱帯熱マalaria原虫ガメトサイトのヒト細胞への接着メカニズムを解明するために、以下の複数のアプローチで研究を行った。</p> <p>① <u>ガメトサイト感染赤血球の表層分子の遺伝子改変および発現・局在解析</u></p> <p>本研究ではガメトサイト細胞表層への局在が確認されている6種類の遺伝子を選定し、ノックダウン原虫を作出する。本研究では、これら6種類の遺伝子ノックダウン用のプラスミドを作出し、そのうちのひとつを熱帯熱マalaria原虫NF54株にトランスフェクションした。薬剤選択を行うことでプラスミドを保持する原虫の作出に成功し、現在多段階の薬剤選択を進めて目的のノックダウン原虫の作出を行っているところである。</p>		

	<p>② 熱帯熱マalaria原虫遺伝子改変レポーターラインの性状解析 ガメサイト期研究のための新たなツールとなるレポーターラインの開発研究に従事した。本研究では、以前に作出した GFP-NanoLuc 発現熱帯熱マalaria原虫の性状解析を行い、この原虫がガメサイト期での薬剤アッセイに使用できることを示した。</p> <p>③ ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養系および接着アッセイのセットアップ ヒト体内では、熱帯熱マalaria原虫ガメサイトはヒトの骨髄間葉系幹細胞に接着することが示唆されている。この現象を <i>in vitro</i> で再現するために、市販の骨髄間葉系幹細胞を入手し研究室で培養系を立ち上げた。また、不死化した骨髄間葉系幹細胞も入手することができ、この細胞も順調に培養することができた。これらの細胞を使った熱帯熱マalaria原虫ガメサイト接着アッセイを構築中である。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>本研究では、熱帯熱マalaria原虫ガメサイト感染赤血球の表層分子の遺伝子改変原虫の作出を進めた。また、これと並行して新たなレポーターラインの開発研究を行い論文発表の準備を進めた。さらに、ガメサイトのヒト細胞への接着アッセイ系の構築を志向して、ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養系を構築した。本研究成果により、ガメサイトのヒト細胞への接着の分子基盤が明らかになると期待される。</p> <p>以下に発表予定の原著論文の概要を記載する。 【概要】 ルシフェラーゼを発現するマalaria原虫は、抗マalaria化合物の評価に広く利用されている。我々は、マalaria原虫の複数のステージに有効な新規抗マalaria薬をスクリーニングするために、ライフサイクル全体を通して NanoLuciferase (NanoLuc) を構成的に発現する新規熱帯熱マalaria原虫レポーターラインを作成した。NanoLuc を発現するレポーターラインは赤内期、ガメサイト、蚊、肝臓の各ステージで定量的な NanoLuc シグナルを示した。また、化合物の抗マalaria活性を赤内期、ガメサイト、肝臓の段階で評価するアッセイ系を確立し、いくつかの抗マalaria化合物の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) 値を決定しました。この堅牢なハイスループット・スクリーニング・システムの開発を通じて、赤内期の寄生虫を死滅させる抗マalaria化合物を同定した。本研究は NanoLuc レポーターラインの有用性を明らかにするものであり、ヒトマalaria原虫を標的とする化合物の多段階スクリーニングにより抗マalaria薬開発を促進することができる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>【原著論文】 A versatile <i>Plasmodium falciparum</i> reporter line expressing NanoLuc enables highly sensitive multi-stage drug assays. Miyazaki Y*, Vos MW, Geurten FJA, Bigeard P, Kroeze K, Yoshioka S, Arisawa M, Inaoka DK, Soulard V, Dechering KJ, Franke-Fayard B, <u>Miyazaki S*</u> <i>Communications Biology</i>. In press. * Corresponding author</p> <p>【学会発表など】 1. オンラインセミナー熱研夏塾 2022「感染症研究のキャリアパス」(長崎大学アウトリーチ活動) 「マalaria原虫がヒト・蚊に寄生する仕組みに魅せられて」宮崎真也 2. 招待講演: 第 95 回日本生化学会大会シンポジウム「若手研究者が切り拓く生化学の学際的フロンティア」 「創薬・ワクチン開発のための遺伝子組み換えマalaria原虫レポーターライン」宮崎真也</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月26日

採択番号	2022-共同-6		
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	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	まさたに 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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>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。</p>		
研究経過の概要	<p>申請者らは、急速凍結・凍結割断レプリカ標識(QF-FRL)法によってグリセリン脂質の一つであるホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)と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, 2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。</p>		

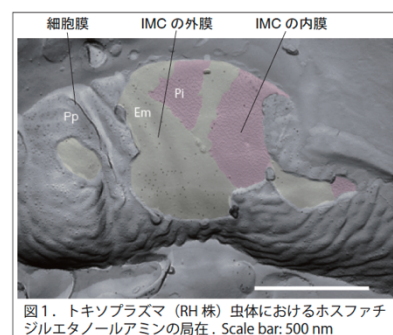


図1. トキソプラズマ (RH株) 虫体におけるホスファチジルエタノールアミンの局在. Scale bar: 500 nm

<p>研究成果の概要</p>	<p>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であるホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn, 図1) およびホスファチジルセリン (PtdSer, 図2) の微細分布を明らかにした。<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。PtdSer に対し、PtdEtn では、細胞膜よりも IMC 膜の方が標識が多く、全ての膜で外葉の方が標識密度が高いものであった。RH 株と PLK 株を比較した場合、PtdSer については、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。また、PtdEtn については、全ての膜において 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 および PtdEtn の発現量はその感染性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。</p> <div data-bbox="810 315 1401 842" style="text-align: center;"> <p>図2. トキソプラズマ (RH 株) 虫体におけるホスファチジルセリンの局在 Scale bar: 500 nm</p> </div>
<p>研究成果の発表</p>	<p>Rikako Konishi, Kayoko Fukuda, Sayuri Kuriyama, Tatsunori Masatani, Xuenan Xuan, Akikazu Fujita, Unique asymmetric distribution of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in <i>Toxoplasma gondii</i> revealed by nanoscale analysis, <i>Histochem. Cell Biol.</i> 2023, in press.</p>

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>

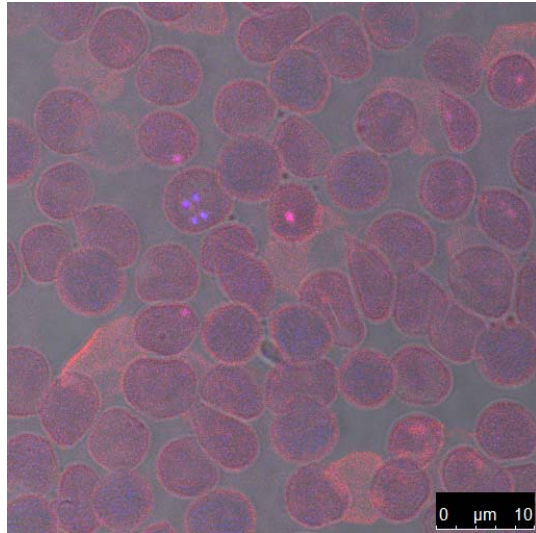


図 1. *B. microti* 感染 SCID-HuRBC マウス

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。

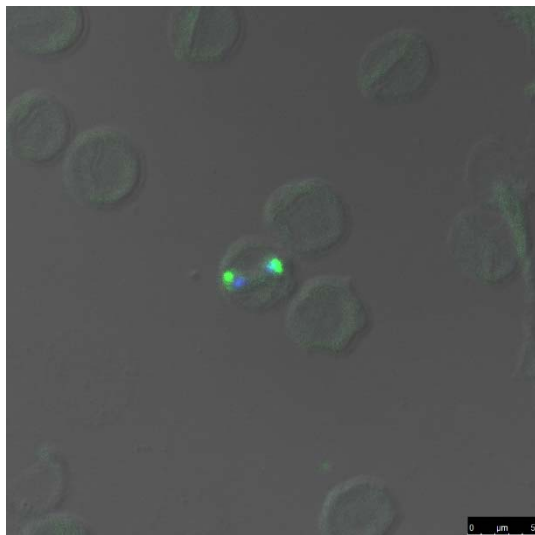


図 2. MSA2a の局在観察。緑色蛍光:Myc タグ付加した MSA2a。青色蛍光:核染色。アピカルエンドに局在していることがわかる。

研究成果の
発表

特記事項なし。

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7日

採択番号	2022-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	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>		
研究経過の概要	<p>①オーカイネートの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マラリア原虫に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。②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。③雄蚊での発現変動が $fc \geq 10$ の 5 遺伝子のうち 3 遺伝子について、雌蚊の感染血吸血時と非感染血吸血時で遺伝子変動を比較したところ、雌蚊においてもそれら遺伝子発現に差がみられた。④加えて、オーカイネートの中腸細胞の通過および吸血血液がオーシスト分化にどのような影響を与えるかを検討した結果、オーカイネートによる中腸細胞の通過の有無はオーシストの大きさに影響せず、吸血血液はオーシスト形成(大きさ)に影響する因子が</p>		

	存在することが示された。
研究成果の概要	<p><i>P. berghei</i> のオーカイネートのインジェクション感染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た。オーシストの大きさを比較すると、インジェクション後 12 日目から 14 日目において雄蚊の方が雌蚊よりオーシスト径が大きかった。さらに、オーカイネートのインジェクション感染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、マウスへの感染が確認されスポロゾイトに感染性があることが示された。</p> <p>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った。さらに、雄蚊での発現変動が $fc \geq 10$ の 5 遺伝子のうち 3 遺伝子について、雌蚊の感染血吸血時と非感染血吸血時で遺伝子変動を比較したところ、雌蚊においてもそれら遺伝子発現に差がみられた。今後、これらの結果を基に、ハマダラカのマalaria原虫ベクターコンピテンシー制御因子の同定を目指し順次解析を行う予定である。</p> <p>加えて、オーカイネートの中腸細胞の通過および吸血血液がオーシスト分化にどのような影響を与えるかを検討した。すなわち、雌 <i>A. stephensi</i> に浣腸を行い、直接中腸内腔にオーカイネートを入れて感染させ、中腸細胞基底膜下にオーシストを形成させる感染方法を用いた(浣腸感染)。インジェクション感染群、浣腸感染群において形成されたオーシスト径を比較したところ、差はみられなかったことから、オーカイネートによる中腸細胞の通過の有無はオーシストの大きさに影響しないことが示された。次に、吸血血液の影響を比較するために、インジェクション感染および浣腸感染直後に非感染血を吸血させてオーシスト径を比較したところ、インジェクション感染では吸血の有無により大きさに差がみられなかった。しかしながら、浣腸感染では吸血させた方のオーシスト径が明らかに大きくなった。このオーシスト径と感染マウスを吸血して形成された通常のオーシスト径とは差がみられなかった。このことから、吸血血液はオーシスト形成(大きさ)に影響する因子が存在することが示された。</p>
研究成果の発表	<p><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 第 91 回日本寄生虫学会大会(2022 年 5 月)</p> <p>Formation of free oocysts in <i>Anopheles</i> mosquitoes injected with <i>Plasmodium</i> ookinetes. Haraguchi, A., Takano, M., Hakozaki, J., Nakayama, K., Nakamura, S., Yoshikawa, Y., Fukumoto, S., Kusakisako, K., Ikadai H. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> submitted</p>

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15日

採択番号	2022-共同-9		
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の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	日本ダニ学会・会長	
	たけだ なおき 武田 直樹	東京農工大学大学院生物システム応用科学府・大学院生	
	のるえいでん がじい あぶるはどる Noureldin Abuelfadl Ghazy	石原産業株式会社中央研究所・研究員	
	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	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>農作物の約3割は病害虫によって消失し、食料不足に拍車をかけている。このうちハダニ類(胸板ダニ上目:汎ケダニ目:ハダニ科)は、殺虫剤に対する抵抗性を急速に発達させる難防除害虫の代表格であり、持続可能な防除手法の研究開発が進められている。その一つが、捕食性天敵であるカブリダニ類(胸穴ダニ上目:トゲダニ目:カブリダニ科)の利用である。カブリダニ類の利用は、半世紀以上にわたって研究が進められ、国内でも複数種のカブリダニ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額は約7億円で、近年も増加傾向である。ただし、この金額は、国内における殺虫剤全体のわずか0.6%程度であり、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。</p> <p>ミヤコカブリダニ(<i>Neoseiulus californicus</i>; 以下、ミヤコ)は国内土着種であり、カブリダニ剤としても用いられている。ハダニ類のみ捕食する狭食性のカブリダニ種とは異なり、ミヤコは広食性であるため、その大量生産には、ハダニ類以外にも小型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、これら餌の管理は煩雑であり、安定的なミヤコ生産のためには人工飼料の開発が重要である。他方、カブリダニ類と同じ胸穴ダニ上目に属するマダニ類(マダニ目:マダニ科)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 vitellogenin(Vg)の合成が制御されることが判明している。ミヤコの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すれば、卵形成を促す栄養成分の高効率</p>		

	<p>なスクリーニングが期待できる。さらに、その栄養成分を含有する人工飼料の開発、延いては安定的なミヤコ生産体制の構築も期待できる。ただし、ミヤコのゲノム情報は不足しているため、分子マーカーの探索は困難である。そこで本研究では、まずミヤコのゲノム全塩基配列を解読し、TOR 経路や Vg 合成系を解析するための情報基盤を整備した。</p>
研究経過の概要	<p>ミヤコ卵および成虫からゲノム DNA を抽出し、NovaSeq 6000 を用いたショートリードシーケンシング(リード長:150 bp、深度:81.24×)および MinION を用いたロングリードシーケンシング(N50:2.538 kb、深度:115.4×)を実施した。低品質リードの除去後、MaSuRCA(ver. 4.0.8)を用いたハイブリッドアセンブリを実施し、264 のスキホールドを取得した(N50:1.359 Mb)。本種のゲノムサイズは 179.6 Mb と推定され、既報のカブリダニ 2 種のそれと同等であった。近縁種との相同性および既知の遺伝子配列に基づいた遺伝子予測により、TOR 経路や Vg 合成系で機能する遺伝子群(このうち、Vg は 4 遺伝子)を推定した。</p>
研究成果の概要	<p>飢餓処理(24 h)の有無による比較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、ミヤコの Vg の動態を調査した。その結果、いずれの Vg も飢餓処理によって RNA およびタンパク質レベルで発現低下する傾向がみられた。今後はこれら Vg の機能解析や TOR 経路の動態解析を進め、卵形成経路におけるマーカー遺伝子を同定し、多産系統の分子育種を目指す。本成果は第 31 回日本ダニ学会大会にて発表した(以下参照)。</p>
研究成果の発表	<p>武田直樹, 新井優香, 鈴木伽奈, 片岡孝介, 由良敬, 白藤(梅宮)梨可, N.A. Ghazy, 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と飢餓応答因子のマルチオミクス解析. 第 31 回日本ダニ学会大会, 京都, 2022 年 9 月 17-18 日(口頭)</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月26日

採択番号	2022-共同-10		
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	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析		
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、作用機序解析	
研究分担者	なかむら ふみあき 中村 文彬	早稲田大学大学院先進理工学研究科・助教 活性化化合物の精製・構造決定	
	おおえだ かずき 大枝 一喜	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士2年 活性化化合物の精製・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	
研究期間	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>トリパノソーマ症に対する既存の薬剤には耐性株の出現や副作用などの問題があるため、依然として新たな治療薬開発のニーズは高い。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探索し、それらの作用機序解析を行うことを目的とする。具体的には、研究代表者が保有する海洋生物サンプルライブラリーを対象として、抗原虫活性スクリーニングを行い、ヒットサンプルから抗トリパノソーマ活性を有する天然化合物を探索する。研究代表者は研究分担者と協力して化合物の単離・同定・作用機序解析を担当し、貴センター菅沼啓輔助教が抗原虫活性試験を担当する。代表者の研究については一部を本共同研究経費により実施する。</p>		
研究経過の概要	<p>当研究室が保有する海洋無脊椎動物抽出物ライブラリー計 5,622 サンプルに対して、<i>T. congolense</i> に対する抗トリパノソーマ活性を指標としたスクリーニングを行った結果、125 サンプルがヒットした。大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿に着目して活性本体の探索を行った。海綿抽出物の分画・精製を行い、単離した活性成分について MS・NMR スペクトルを測定し、得られたスペクトルを解析し、活性本体は新規アルカロイドであることが明らかとなった。</p> <p>一方、食品中の抗トリパノソーマ活性化化合物に着目し、埼玉産春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> について活性本体の探索を行った。その結果 coronarin D をはじめとする抗トリパノソーマ活性化化合物を得た。これらの活性化化合物について、作用機序解析のため、原虫抽出物に含まれる標的タンパク質の探索に用いるプローブ分子の合成を行っている。</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、当研究室が保有する海洋無脊椎動物 2,811 検体から調整した、水溶性画分と脂溶性画分の計 5,622 サンプルに対して、<i>T. congolense</i> に対する抗トリパノソーマ活性を指標としたスクリーニングを行った結果、125 サンプルがヒットした。ヒットサンプルの中で抗トリパノソーマ活性と細胞毒性の比較を行い、選択的に抗トリパノソーマ活性を示した大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿に着目して活性本体の探索を行った。本海綿のメタノール抽出物を溶媒分画に付し、得られた活性画分を、ODS フラッシュカラムクロマトグラフィーおよび SiO₂ オープンカラムクロマトグラフィーにより順次精製し、化合物 1 を得た。化合物 1 の MS および各種 NMR スペクトルを測定し、スペクトル解析を行ったところ、化合物 1 はイミダゾール環を含む新規アルカロイド化合物であると構造決定できた。</p> <p>本化合物については、化学プローブが結合したビーズを合成し、プローブ分子に結合する標的タンパク質をトリパノソーマ原虫抽出物からつり上げ、SDS-PAGE および MS/MS 解析によって同定する予定である。同定した標的タンパク質について、パスウェイ解析を行うことで、化合物の作用メカニズムを検討する。</p> <p>また、食品中に含まれる抗トリパノソーマ活性化合物の探索を目的として、埼玉産春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> 抽出物について <i>T. congolense</i> に対する発育阻害活性成分の探索を行った。<i>Curcuma aromatica</i> 抽出物について、活性画分を各種クロマトグラフィーを用いて精製した。活性本体の MS、NMR スペクトルを測定し、そのスペクトルを解析することで coronarin D (IC₅₀ = 1.5 μM) およびその類縁体を活性本体として同定した。これらの化合物について、抗トリパノソーマ活性に関する構造-活性相関解析の結果、活性発現に重要な構造モチーフを明らかにしたため、論文としてまとめている。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>(論文)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nakamura, F.; Kimura, H.; Fusetani, N.; Nakao, Y. Two Onnamide Analogs from the Marine Sponge <i>Theonella conica</i>: Evaluation of Geometric Effects in the Polyene Systems on Biological Activity. <i>Molecules</i>, 28, 2524, (2023). https://doi.org/10.3390/molecules28062524. 2. Aihara, K.; Nakamura, F.; Nakao, Y. Alotamide B, a New Cyclic Depsipeptide Isolated from Assemblies of Marine Cyanobacteria, Mainly Consisting of <i>Moorena</i> sp. <i>Chem. Lett.</i>, 52, 270-272, (2023). https://doi.org/10.1246/cl.230035 <p>(学会発表)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 大枝一喜, 菅沼啓輔, 中村文彬, 中尾洋一, 『春ウコン由来の抗トリパノソーマ活性化合物の探索』, 第 12 回 CSJ 化学フェスタ 2022, 東京, 2022.10.18. 2. 大枝一喜, 菅沼啓介, 中尾洋一, 『春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> 由来抗トリパノソーマ活性化合物の探索』, 第 91 回日本寄生虫学会大会, 帯広, 2022.5.28.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年5月31日

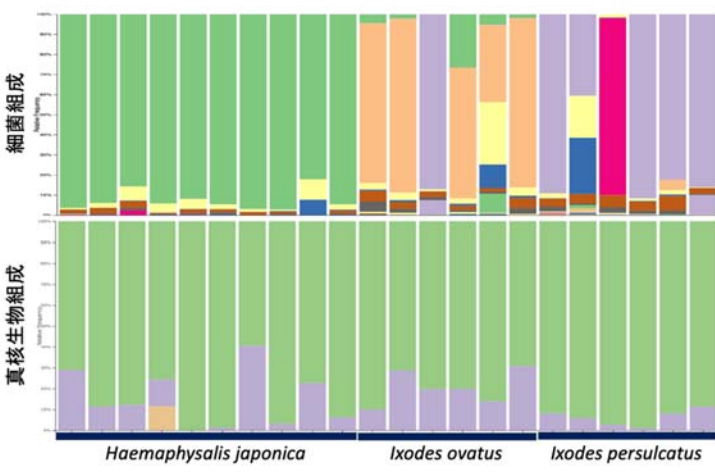
採択番号	2022-共同-11		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	ネズミマラリア原虫における Brca2 による雌ガメートサイトへの分化		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	よしかわ やすなが 吉川 泰永	北里大学獣医学部・准教授	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>マラリア原虫における雌雄ガメートサイトへの分化は、マラリア原虫の生活環において必須のステージである。我々は相同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。</p>		
研究経過の概要	<p>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。</p> <p>5月に貴研究センターを訪問した上で福本先生と研究内容についてディスカッションを行った。さらに、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。</p> <p>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てきた。2022年度にはこれまでに得られた成果を論文にまとめ発表し、さらに第91回日本寄生虫学会大会や第165回日本獣医学会学術集会において学会発表を行った。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>Brca2 のドメインの機能解析</p> <p>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、ガメートサイトの形成数、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、このオーシストにはスポロゾイトが形成されないことも観察した。</p> <p>今年度は、マラリア原虫 Brca2 のどの領域が発見した表現型、特にガメートサイトの分化に必要であるか解析するために全長 Brca2 のクローニングを試みた。しかしながら、全長 Brca2 のクローニングには現在までのところ成功していない。これはマラリア原虫の遺伝情報が AT リッチなため大腸菌で増幅しにくいためと予想された。そこで、全長ではなく、Brca2 のドメインの一部をクローニングし、野生型ネズミマラリア原虫に導入する計画を考えた。マラリア原虫 Brca2 のドメインとして、相同組換え酵素 Rad51 と相互作用する領域である BRC repeats と呼ばれるドメインと DNA と相互作用する可能性がある OB-Tower ドメインのクローニングに成功した。これらのドメインは、赤色蛍光タンパク質である DsRed-Monomer との融合タンパク質を発現するベクターにクローニングした。現在、ネズミマラリア原虫にトランスフェクトすることを試みている。</p> <p>ネズミマラリア原虫 Brca2 の OB-Tower ドメインは、AlphaFold2 による立体構造解析により、ヒト BRCA2 の OB-Tower ドメインと類似している領域として推定した。立体構造として DNA と相互作用する可能性が高いと考えられるが、実際に DNA との相互作用は証明されていない。そこで、リコンビナントタンパク質を発現、精製して、実際に DNA と相互作用することを <i>in vitro</i> において確認する計画を立てた。この解析に必要なリコンビナントタンパク質を発現するためのベクターを現在、構築中である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Yoshikawa Y</u>, Kimura S, Soga A, Sugiyama M, Ueno A, Kondo H, Zhu Z, Ochiai K, Nakayama K, Hakozaiki J, Kusakisako K, Haraguchi A, Kitano T, Orino K, Fukumoto S, Ikadai H. <i>Plasmodium berghei</i> Brca2 is required for normal development and differentiation in mice and mosquitoes. <i>Parasit Vectors</i>. 15(1):244. (2022) 査読有 2. 木村 駿太、<u>吉川 泰永</u>、曾賀 晃、杉山 真言、朱 子達、他 5 名, <i>Plasmodium berghei</i>(ネズミマラリア原虫)における減数分裂関連タンパク質 Brca2 の機能解析, 第 165 回日本獣医学会学術集会, 2022 年 9 月 3. <u>吉川 泰永</u>、木村 駿太、曾賀 晃、杉山 真言、朱 子達、他6名, ネズミマラリア原虫 <i>Plasmodium berghei</i> における相同組換えタンパク質 Brca2 機能解析, 第 91 回日本寄生虫学会大会, 2022 年 5 月

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7日

採択番号	2022-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	白藤 梨可
研究課題名	マダニ卵形成に貢献する共生微生物の探索		
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	マッケンジー クワク Mackenzie Kwak	北海道大学大学院獣医学研究院・JSPS PD	
	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	
	ばば さおり 馬場 佐織	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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニは様々な病原体を保有し、吸血の際に人や動物に伝播する。一方で、マダニは病原体以外にも様々な微生物を保有しており、マダニとの共生関係を築いている。抗生物質を用いて人為的に共生微生物叢を攪乱した場合、マダニの生存力(産卵数や孵化率)が著しく低下することから、一部の共生微生物はマダニの生理活動にとって重要と考えられる。これらの共生微生物は、進化の過程で宿主に高度に適応しており、多くの場合、介卵伝播することで次世代へ効率的に受け継がれる。本研究では網羅的解析手法を用いることで、マダニで介卵伝播する微生物の検出を目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>【マダニのサンプリング】 マダニは野生動物体表から tick twister 等を用いて回収した。北海道のエゾシカ、アライグマ、ヒグマ、ウシ、さらに本州のニホンジカ、イノシシ、ツキノワグマを検索対象とした。</p> <p>【実験室内でのマダニ飼育】 得られたマダニは 25 度のインキュベータで個別に一定期間飼育し、産卵および幼ダニの孵化を待った。幼ダニは体表を洗浄後、-80 度に保管した。</p> <p>【網羅的微生物検出】 幼ダニより DNA を抽出し、細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子を PCR 増幅した。また、真核生物の 18S リボソーム RNA 遺伝子の増幅は、マダニ遺伝子に特異的に結合するブロッキング PNA を添加した PCR により実施した。これらの PCR 産物を元に Illumina シーケンスライブラリーを作製し MiSeq により解読した。得られたシーケンスリードは Qiime2 により解析し、幼ダニに含まれる微生物の組成を決定した。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>【マダニのサンプリング】 2022年5月から12月にかけて、合計196個体の飽血および部分吸血マダニを野生動物個体から回収した。実体顕微鏡による種同定の結果、チマダニ属 (<i>Hemophilic</i>) は5種 (<i>H. longicornis</i>, <i>H. flava</i>, <i>H. japonica</i>, <i>H. megaspinosa</i>, <i>H. kitaokai</i>)、マダニ <i>Ixodes</i> 属は3種 (<i>I. ovatus</i>, <i>I. tanuki</i>, <i>I. persulcatus</i>) が含まれていた。回収時の重量は最も小さいものでニホンジカに寄生していた <i>H. flava</i> の3.3 mg、最大でアライグマに寄生していた <i>I. persulcatus</i> の357.2 mgであった。</p> <p>【実験室内でのマダニ飼育】 産卵・孵化試験に用いた8種196個体のマダニのうち、<i>H. kitaokai</i> 以外の7種68個体で産卵が見られ、幼ダニが得られた。</p> <p>【網羅的微生物検出】 これまでのところ、<i>H. japonica</i>, <i>I. ovatus</i>, <i>I. persulcatus</i> の3種22検体についての解析が完了し、細菌群ではコクシエラ、リケッチア等の配列が確認された(図1)。また、真核生物としては、<i>H. japonica</i> の1検体から <i>Babesia</i> 属の配列が検出された。今後、介卵伝播した微生物の詳細な遺伝的分類を行い、宿主マダニへの影響解析につなげたい。</p>  <p>図1. 孵化した幼ダニから検出された微生物群</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

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-13		
研究部門	創薬研究部門	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	抗原虫作用を示す微化研由来天然化合物における分子標的の解析		
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 研究総括と実験の実施	
研究分担者	いがらし まさゆき 五十嵐 雅之	(公財)微生物化学研究会微生物化学研究所・部長 化合物生産菌ブロスおよび化合物ライブラリー資源の開発	
	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 (役割分担)原虫サンプル調製, 抗原虫活性の検証	
研究期間	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>トキソプラズマは、世界人口の1/3以上が感染していると推定されている。その感染により、流産、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回避できない問題となっている。さらに、畜産業界において、アピコンプレクサ原虫他、原虫感染症による家畜の生産性の低下が国内外で問題視され、経済的損失は大きく、地球規模での被害額は年間約数千億円にのぼるとの試算もある(Reichel et al. <i>Int J Parasitol.</i> 2012)。一方、世界三大感染症のマラリアは、世界で年間3~5億人が罹患し、その内約200万人もの命を奪い、コロナ禍に影響されることなく医学分野で重要な疾患である。我々は、有効な抗原虫薬を開発するために、当研究所で分離した放線菌、糸状菌由来の天然物を中心に化合物のライブラリー化を進めている。その成果として、トキソプラズマ症モデルに対して有効な治癒効果を示す MCF を初め、キジマイシン、スパルソマイシン他、抗マラリア作用を示すアミノペプチダーゼ阻害剤の PBT など原虫薬候補化合物を西川義文教授と共同で発見している。我々は、原虫の小胞体機能および小胞体を含む分泌経路が有効な薬剤標的の一つであることを突き止めている。しかしながら、原虫の分泌経路における小胞輸送の分子レベルでの実体について未だ解っていない点が多い。</p> <p>本申請は、MCF の標的および作用機序を中心に抗原虫活性を示すライブラリー化合物の作用機構を解明することを目的とし、優れた原虫創薬の基盤構築に繋げる。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>原虫病薬は、市場規模が新規薬剤の開発費を下回る。したがって製薬企業がその開発に積極的に着手しないのが現状である。利潤に左右されない大学とわれわれ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。</p> <p>これまでに、われわれ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。さらに、MCF は抗ネオスポラ、抗マラリア活性を示すことも確認した。一方、マラリア原虫に高い抗原虫活性を示す PBT を見出した。PBT は、トキソプラズマには、抗原虫活性を示さなかった。MCF の実用化に向けて動物実験による作用機序解析を行う必要がある。その為に MCF の生産量を担保する必要がある、われわれは生産菌による発酵(育種法)で化合物を効率的に得る手法を開発した。われわれは、MCF の原虫に対する有効な作用点の一つが輸送系、ストレス応答に関わる小胞体の機能であることをこれまでに示してきた。しかしながら未だ分子レベルでの証明に至っていない。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>DKP 誘導体の MCF は、トキソプラズマ、ネオスポラおよびマラリア原虫に対する抗原虫活性を示し、MCF がマラリアの既存薬クロロキンと同レベルの抗原虫活性を持つ。MCF は、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踏まえると次世代のマラリア薬として、もしくは、新規アピコンプレクサ門原虫の新規の抗原虫活性を示す薬剤として発展することが期待できる。現存の 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、種々の実験動物による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った。この現状を打開するために、われわれは、低コストで且つ効率的な MCF の生産方法の開発における基盤構築を行い、育種による生産およびカラム精製で MCF を得ることに成功した。MCF は、経口投与で高い抗原虫作用を示すことを確認している。今後は、MCF の作用する dose, 吸収, 排出について詳細を解析する必要がある、現在、解析を進めている。</p> <p>一方、MCF の抗原虫作用において、これまでにトランスクリプトーム解析から原虫の小胞体および核に作用している可能性を示し、特に、原虫の小胞体におけるストレス応答機構、Sar1GTPase により形成する COPII 小胞、さらに、その小胞輸送経路を経由すると考えられる各エフェクター、アミノペプチダーゼなどの分泌カーゴも標的となる結果が得られた。原虫の小胞体におけるストレス応答機構は、哺乳類や酵母で解っている従来の機構と大きく異なる分子機構と考えられている。さらに、細胞死のメカニズムについても同様に未だわかっていない。したがって、その解明は、新たな分子標的の開発につながり、新たな創薬研究の発展に重要である。</p> <p>本年度は、トキソプラズマの小胞体における COPII 小胞形成に働くと考えられる Sar1GTPase に対するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)と予想される因子が Sar1 と同様に MCF の作用部位と考えられたので、その同定を行った。これまで原虫で GEF の存在が明らかにされていなかった。さらに、トキソプラズマ、マラリア原虫など一部のアピコンプレクサ以外の原虫では未だにゲノム上で確認されていない状況である。酵母、哺乳類などの Sar1GEF で保存される Sec7ドメイン、WD リピートドメイン、II 型膜タンパク質のトポロジーを考慮し、トキソプラズマ Sar1GEF を酵母変異株を用いて機能相補する因子を同定した。さらに、その特異的抗体を調製し、トキソプラズマ動物培養細胞感染モデル系のライセートにおいて、トキソプラズマ Sar1GEF が発現していることを確認した。従って、原虫において実際に Sar1GEF が働いている可能性が示された。</p> <p>現在、酵母変異株を相補するトキソプラズマ Sar1GEF 発現系を用いて触媒機能に必要な最小部位、小胞体局在化シグナルについて解析中である。</p>

<p>研究成果の 発 表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leessombun A, Iijima M, Umeda K, Kondoh D, Pagmadulam B, Abdou AM, Suzuki Y, Ohba SI, Isshiki K, Kimura T, Kubota Y, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin is a potent therapeutic drug candidate for toxoplasmosis. <i>J Infect Dis.</i> 221 (5).pp764-776. doi: 10.1093/infdis/jiz501. 2020. 2. Leesombun A, Iijima M, Pagmadulam B, Orkhon B, Doi H, Sawa R, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Metacytofilin has potent anti-malarial activity. <i>Parasitol Int.</i> 2021 81, 102267. doi:10.1016/parint.2020.102267. 2021. 3. <u>Nihei C</u>, Nakanishi M. Cargo selection in the early secretory pathway of African trypanosomes. <i>Parasitol Int.</i> 84, 102379. doi: 10.1016/j.parint.2021.102379. 2021. 4. Leesombun A, Kondoh D, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Polyether ionophore kijimicin inhibits growth of <i>Toxoplasma gondii</i> and controls acute toxoplasmosis in mice. <i>Parasitol Res.</i> doi: 10.1007/s00436-021-07363-w. 2021. 5. Arieftha NR, Pagmadulam B, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Sparsomycin Exhibits Potent Antiplasmodial Activity In Vitro and In Vivo. <i>Pharmaceutics.</i> 14(3):544. doi: 10.3390/pharmaceutics14030544. 2022.
----------------------	---

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5日

採択番号	2022-共同-14		
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	フタトゲチマダニから同定されたアクアポリンの特性解明		
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	みやた たけし 宮田 健	鹿児島大学農学部・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	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニの吸血行動は、幼・若・成ダニ期に約1週間ずつ、生涯で計3回行なわれる一大イベントである。マダニの吸血行動において、細胞膜に発現するアクアポリン(AQP)は細胞膜を介して水分子を輸送し、血液を濃縮していることが考えられる。そこで、本研究は化学的殺ダニ剤にかわる抗マダニワクチンに着目し、そのワクチン候補分子として、AQPの特性を調べることを目的とした。すなわち、本研究の成果は、マダニの生存基盤である吸血消化を根本的にたたき、環境にやさしいAQPを標的とする抗マダニワクチンの開発につながる可能性が高い。</p>		
研究経過の概要	<p>1. 研究目的</p> <p>マダニは脊椎動物の血液を栄養源とし、その生活史は「未吸血」と「飽血」で成り立っている。マダニの吸血行動は、幼・若・成ダニ期に約1週間ずつ、生涯で計3回行なわれる一大イベントである。</p> <p>吸血節足動物の吸血行動においてAQPは重要な分子である。細胞膜に発現するAQPは水分子を水チャネルによって細胞膜を介して輸送する。そのため、マダニは大量の血液を吸血する時に、体内でAQPを通じて水分を排出し、血液を濃縮していることが考えられる。</p> <p>化学的殺ダニ剤のほぼ全ては、農薬の転用・流用にすぎない実態が世界的に半世紀以上も継続しているため、薬剤耐性マダニや残留問題などの弊害を招いている。そこで、化学的殺ダニ剤にかわる抗マダニワクチンに着目し、そのワクチン候補分子として、水分調節機構を担うAQPに焦点を絞り、本研究ではAQPの特性を調べることを目的とした。</p>		

	<p>2. 材料と方法</p> <p>①酵母による組換え AQP の発現 フタトゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから <i>AQP</i> 遺伝子をクローニングし、遺伝子解析を行った。その後 RT-PCR 法によって増幅した <i>AQP</i> の cDNA を酵母発現用ベクターに組み込んだ後、エレクトロポレーターを用いて酵母(<i>Pichia pastoris</i>)に導入した。</p> <p>②フタトゲチマダニにおける AQP の特性解明 フタトゲチマダニにおける <i>AQP</i> の特性を解明するために、<i>AQP</i> 遺伝子の発現を臓器別、吸血日数別にそれぞれ RT-qPCR によって発現動態を調べた。また、RNA 干渉法による <i>AQP</i> 遺伝子発現の抑制を行い、マダニの吸血時間、体重変化、生存率、産卵、孵化などの変化を観察し、マダニの吸血・繁殖生理における <i>AQP</i> の役割について検討した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>3. 結果</p> <p>①フタトゲチマダニにおける AQP 遺伝子の同定および AQP の特徴 フタトゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから完全長 <i>AQP</i> cDNA を得、塩基配列解析を行ったところ、3341 bp で、ORF は 876 bp であり、その推定産物は 291 アミノ酸であった(推定分子量 30.9 kDa)。これらのアミノ酸から 6 回膜貫通型のタンパク質であり、1箇所の N-型糖鎖結合部位が存在することが推定された。我々はこの配列情報を基に酵母を用いて組換え体の作製を行ったが、<i>AQP</i> が膜タンパク質であるため、発現および精製することができなかった。</p> <p>②フタトゲチマダニにおける AQP 遺伝子の発現ならびに AQP 遺伝子抑制の及ぼす影響 フタトゲチマダニの臓器における <i>AQP</i> 遺伝子の発現動態を調べたところ、吸血に従って、唾液腺、中腸、マルピーギ管で発現レベルが増大した。しかし、中腸では未吸血状態でも発現レベルが高かった。</p> <p>RNA 干渉法による <i>AQP</i> 遺伝子発現の抑制を行ったところ、飽血時まで <i>AQP</i> 遺伝子抑制群はコントロール群に比べて表現型の差に大きな違いはなかった。しかし、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群を解剖したところ、コントロール群に比べて、飽血後の中腸内容物は白く、中腸とマルピーギ管の形態が変化していた。また、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群はコントロール群に比べて産卵数も低下した。</p> <p>4. 考察 <i>AQP</i> は推定されたアミノ酸配列から細胞膜に発現している可能性が示唆された。また、RNA 干渉法の結果から、<i>AQP</i> は中腸やマルピーギ管において水分調節や排せつに重要な分子であり、吸血中の血液濃縮に関与していることが考えられた。</p> <p>今後は抗 <i>AQP</i> 抗体を用いて、唾液腺、中腸、マルピーギ管における <i>AQP</i> の局在を調べる必要がある。さらに、<i>AQP</i> 遺伝子抑制群の唾液腺、中腸、マルピーギ管、卵巣の変化について組織レベルで観察することによって、マダニの吸血における <i>AQP</i> の役割がより明確になることが予想される。</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

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-15		
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	福本 晋也
研究課題名	オス生殖細胞発達障害を持つ熱帯熱マalaria原虫株の原因遺伝因子の同定と機能解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ふるや てつや 古谷 哲也	東京農工大学農学部共同獣医学科獣医伝染病学研究室・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	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>熱帯熱マalaria原虫 (<i>Plasmodium falciparum</i>) はヒトに感染するマalaria原虫の中で最も病原性が高く、現在も、世界で年間40万人以上の感染死亡者が報告されている。複雑なマalaria原虫の生活環において、生殖細胞(ガメートサイト)は感染蚊によってヒトから摂取され、蚊の腸内で生殖するステージだが、蚊の吸血時にヒトに感染するスポロゾイトと共に、生活環の中で最も原虫の数が減少する(ボトルネック)であることが知られているため、伝播阻止ワクチンのターゲットとして非常に重要である。これらの背景を踏まえ、本共同研究では、先行研究以降に利用可能となった次世代シーケンサーを用い、オス生殖細胞に発達障害を持つ Dd2 株に対し、その直接の親株であるがオス生殖細胞が正常に発達する W2 株における染色体 12 ゲノム配列を解読し、ゲノム配列がデータベースに公開されている Dd2 株配列との比較により、Dd2 株のオス生殖細胞発達障害の原因となる遺伝子変異の同定と、遺伝子ノックアウトおよび遺伝子スワップにより遺伝子機能の証明を行う。さらに、同定遺伝子、あるいはそれに関与して発現している遺伝子の産物に対する抗体を作製し、それが、ガメートサイトを摂取した蚊の体内で、<i>P. falciparum</i> の生殖に及ぼす影響を判定し、媒介阻止ワクチン開発における可能性を検証する。</p>		
研究経過の概要	<p>本共同研究では、まず、<i>P. falciparum</i> Dd2 株のオスガメートサイト発達障害の原因遺伝子の同定のため、データベース上の Dd2 株ゲノム配列との比較を行うため、次世代シーケンスにより親株である W2 株のゲノム配列の解読を行った。ゲノム配列は、本学工学部の養王田正文教授との共同研究により、Pacific Bioscience 社と Illumina 社のシーケンスにより、高解像度の W2 ゲノム配列を取得した。コンティグ配列は、最長約 250kb の配列によって構成されていたため、申請者による先行研究において報告された 82 kb を含む染色体 12 上の約 800 kb の領域をカバーする W2 コンティグをマップして、W2 と Dd2 の比較を行った。その結果、まず、82kb の領域(Furuya T et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 102(46):16813-8.)について、Dd2 と W2 に存在する</p>		

	<p>変異を探したところ、非翻訳領域以外に、顕著な変異が見つからなかった。そのため、更に以前の報告 (Vaidya AB et al., Mol Biochem Parasitol. 1995 69(1):65-71.) を参照し、報告された染色体 12 上の遺伝子マーカーを参照として、対象となる遺伝子領域の同定を試みた。その結果、当時、800kb と報告されていた染色体 12 の領域が、最もアップデートした遺伝子マーカーのゲノム上の塩基配列位置によって、367kb の領域となる事が明らかになった。そこで、改めて、この領域に存在する遺伝子群(100 遺伝子程度)について、その翻訳領域における Dd2 株と W2 株の塩基配列の比較を試みた。その結果、2 つの遺伝子において、明らかな遺伝子多型が発見された。一つは、転写因子に相同性を持つ遺伝子で、翻訳領域の前半およそ 1/3 の箇所に存在する点変異による終止コドンにより偽遺伝子となっていた。もう一つの遺伝子は、ヒストン修飾遺伝子であり、翻訳領域の 2/3 の箇所に 27 塩基の配列が挿入されていた。</p> <p>現在、本研究室では上記のゲノム配列解析により同定された Dd2 株のオスガメートサイト発達障害候補遺伝子について、機能の証明をするため、先ず、人血清を用いた熱帯熱マラリア培養系により、ガメートサイトの産生を開始している。ガメートサイトを比較的多く産生する HB3 株を用いてガメートサイトの培養を開始しており、ガメートサイトステージの産生を確認できたため、今後、先ずは、親株の W2 株における遺伝子改変によるオス生殖細胞の機能性を評価するため、上記の候補遺伝子のノックアウト株の作製を行い、成熟ガメートサイト細胞の鞭毛放出数の測定を行う。さらに、Dd2 株の遺伝子改変により、偽遺伝子を野生型の発現遺伝子にスワップを行い、表現型の回復を試みる。これらの実験には、既に確立している CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変システムを活用する。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>上記のように、本研究の成果として、遺伝的に直系でありながら、オス生殖ステージの発達機能が明らかに異なる熱帯熱マラリア寄生虫株 W2 と Dd2 における、染色体 12 上の遺伝子配列比較において、2 つの遺伝子に明らかな多型を発見した。一つは、転写遺伝子における変異による機能的遺伝子の翻訳停止であり、もう一つは、ヒストン修飾遺伝子における明らかな配列挿入であった。これらの遺伝子は、マラリア寄生虫に限らず、真核細胞の分化における遺伝子の転写活性化と、染色体タンパク質修飾による転写制御において、非常に重要な遺伝子であり、上記の熱帯熱マラリア株における生殖細胞の分化と機能発達において、大きな役割が予想される。今後は、この発見をもとに、これらの遺伝子変異が及ぼす生物学的な影響について、遺伝子操作による機能的な実験によって、これら遺伝子の実際の機能を明らかにしていく。そして、更には、ネズミマラリアにおける相同遺伝子の同定により、In vivo 実験においても、最新の CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変システムにより、これらの生物学的な研究を進める予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>現在まで、本研究についての学会発表や論文発表は行われていない。本研究成果については、発見のポテンシャルを鑑み、学会発表、投稿論文発表について、慎重な検討を必要とすると考える。今後、共同研究者と検討の上、発表形式と内容について決定する。</p>

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

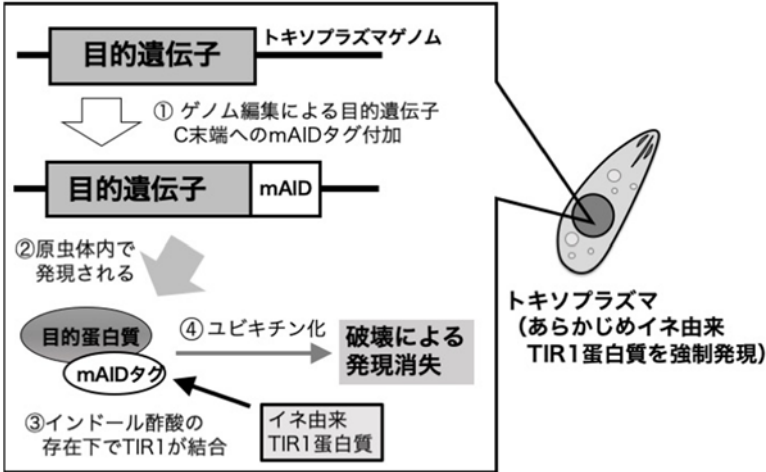
採択番号	2022-共同-16		
研究部門	創薬研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	トキソプラズマ分泌タンパク質の宿主ミトコンドリア機能に対する影響解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	にしごり みつひろ 錦織 充広	福岡大学理学部化学科・助教	
研究分担者	こしば たくみ 小柴 琢己	福岡大学理学部化学科・教授	
	ひらた せりな 平田 聖里菜	福岡大学大学院理学研究科・大学院生	
	まき ゆうか 牧 優香	福岡大学大学院理学研究科・大学院生	
	にしかわ よしふみ 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授	
研究期間	2022年4月1日 ～ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>細胞内小器官の1種であるミトコンドリアはエネルギー産生工場として機能し、真核生物における代謝系などの生命機能の維持に不可欠な役割を果している。近年の研究より、ミトコンドリアは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示されてきた。我々は、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一貫した研究を進め、世界に先駆けてミトコンドリアの生理的な重要性を明らかにしてきた (<i>Nat. Commun.</i> 2014, 2019, 2020; <i>Sci. Rep.</i> 2017; <i>iScience</i> 2019; <i>JBC</i> 2020)。一方、トキソプラズマを始めとする寄生虫が哺乳細胞へ感染した際の宿主ミトコンドリアの役割はほとんど分かっていない。そこで本研究では、トキソプラズマ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挙動を示すかを明らかにすることを目的とする。特にトキソプラズマ原虫由来の分泌性タンパク質群と宿主ミトコンドリアの相互作用に着目し、病原性発現との関連性を明らかにする。また、感染原虫の持つ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ミトコンドリアの機能変化が病原性にどのような影響を及ぼすかについての理解を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>我々のこれまでの予備実験では、一部のトキソプラズマ分泌性タンパク質が宿主ミトコンドリアと強い親和性を持つことが生化学的な実験より明らかになった(未発表データ)。さらに、これらタンパク質を培養細胞内で過剰発現させると、宿主ミトコンドリアに局在することも見出した。これらの知見を基に、本研究では以下の研究計画を実施した。</p> <p>(1)これまでに、宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質を恒常的に発現させたヒト培養細胞を用いた網羅的な相互作用タンパク質探索により、これらの原虫タンパク質と相互作用する宿主ミトコンドリアのタンパク質を複数種、同定している。そこで、抗体を用いた免疫沈降実験や遺伝子導入実験等を用いて、これらのタンパク質間の相互作用の</p>		

	<p>検証実験を試みた。</p> <p>(2)これまでのホスト研究室の西川義文教授との共同研究(2021 年度、小柴琢己教授)では、宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質の遺伝子改変原虫の作成に成功している。そこで遺伝子改変原虫を感染させた細胞を用いて、免疫染色による感染の確認や原虫の感染率・増殖能への影響評価などを実施した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>まず、ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質の安定発現細胞を用いたプロテオーム解析情報に基づき、宿主ミトコンドリア側の相互作用タンパク質を探索した。これまでの細胞分画およびプロテアーゼ耐性実験の結果から、トキソプラズマタンパク質がミトコンドリア外膜に結合することが示されたため、特にミトコンドリア外膜タンパク質に着目して相互作用タンパク質を探索した。免疫沈降による検証実験では、ミトコンドリア外膜貫通型タンパク質および一部の MICOS 複合体構成タンパク質との相互作用が確認されたが、外膜タンパク質の相互作用は限定的であり、タンパク質間相互作用以外の結合要因が存在する可能性が示唆された。</p> <p>そこで、さらなる相互作用因子の探索のため、脂質アレイおよびリポソームを用いた結合試験により膜リン脂質とトキソプラズマタンパク質との相互作用について解析した。その結果、トキソプラズマタンパク質が特定のリン脂質と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、この結合性はリン脂質の脂肪鎖長や不飽和度の違いにより変動することも示された。また、上記リン脂質の合成酵素のうち、ミトコンドリア外膜局在型のサブタイプとトキソプラズマタンパク質が相互作用することが免疫染色および免疫沈降の結果から明らかとなり、ミトコンドリア外膜のリン脂質を介した相互作用が存在することが予想された。</p> <p>一方、野生型およびタンパク質改変型トキソプラズマ原虫を Vero 細胞に感染させ、それぞれ 24, 48, 72 時間後におけるトキソプラズマ原虫の感染率、増殖率、エグレッション率の比較を行った。免疫染色により少なくとも 200 個以上のトキソプラズマ原虫をカウントし(N=4)、上記の値を算出したが、有意な差は見出されず、比較的期間での細胞感染では大きな影響は無いと考えられた。一方、プラークアッセイにより長期間での感染の影響を調べた結果、タンパク質改変型トキソプラズマ原虫では増殖が抑制されていることが明らかとなった。また、ミトコンドリア外膜局在型のリン脂質合成酵素の高発現細胞ではトキソプラズマ原虫のエグレッション率に変動があり、宿主ミトコンドリアが膜リン脂質を介して原虫へ影響を及ぼす可能性が示唆された。</p> <p>以上の内容については現在、論文にまとめて投稿中である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>本共同研究の研究成果について、下記の学会、ワークショップにて発表を行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 錦織 充広: Analysis for the localization of <i>Toxoplasma gondii</i> secretory proteins to the host mitochondria., 第 28 回分子寄生虫学ワークショップ 第 18 回分子寄生虫・マalaria研究フォーラム合同大会(2022 年 8 月) ・ 錦織充広, 牧 優香, 西 翔平, 西川義文, 小柴琢己: 病原性寄生虫・トキソプラズマの分泌タンパク質と宿主ミトコンドリアの相互作用解析, 令和 4 年度日本生化学会九州支部例会(WEB 開催) (2022 年 6 月) ・ 錦織充広, 牧 優香, 西 翔平, 西川義文, 小柴琢己: トキソプラズマ原虫分泌タンパク質の宿主ミトコンドリア膜への局在化の解析, 第 91 回日本寄生虫学会大会(2022 年 5 月)

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7日

採択番号	2022-共同-17		
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	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	
	まさたに 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	2022年4月1日 ~ 2023年3月31日		
目的・趣旨	<p>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。細胞死に関連すると予測された遺伝子を対象とし、ゲノム編集に基づくコンディショナル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。</p>		
研究経過の概要	<p>これまでに、細胞死関連遺伝子として注目し選抜された 2 つの遺伝子 (PDCD2、ELMO1) について相同組換えによるノックアウト原虫作出を試みたものの、成功しなかった。具体的には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、すなわち、これら遺伝子は原虫にとって必須遺伝子である可能性が高いと考えられた。</p> <p>前年度、本課題において、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、glmS リボザイムに基づくコンディショナルノックアウト法の確立を試みたものの、本方法は、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。</p> <p>そこで今年度は、オーキシン誘導デグロン法(図)に基づくコンディショナルノックアウト原虫の作出に向けた準備を行なった。具体的には、トキソプラズマ原虫 Pru Δ Ku80 株を対象とし、イネ由来 OsTIR1 を過剰発現する原虫を作出した。この原虫に CRISPR/Cas9 によって目的蛋白質の C 末端にオーキシン誘導デグロン(mAID)タグを付加し、これに基づいたコンディショナルノックアウト法の確立をおこなうためのプラスミドを作出した。</p>		

	 <p>図 オーキシシン誘導デグロン法</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>Addgene 社より購入した OsTIR1 強制発現プラスミド(#87258)に搭載された薬剤耐性遺伝子 CAT であったため、CAT を既にゲノム中に組み込まれた Pru Δ Ku80 株には適用できなかった。そのため、同プラスミドの CAT を HXGPRT に置き換えたものを導入することで、OsTIR1 発現 Pru Δ Ku80 株を作出した。</p> <p>次に、PDCD2 及び ELMO1 のコンディショナルノックアウト原虫を樹立するため、Addgene 社より購入した mAID-HXGPRT カセット搭載プラスミド(#87258)の HXGPRT カセットを DHFRTSc3 遺伝子に置き換えたプラスミドを作出し、これを鋳型に PCR 産物として mAID-DHFRTSc3 カセットを増幅し、それぞれの遺伝子の C 末端に mAID が融合するよう設計した CRISPR/Cas9 プラスミドとともに導入した。ピリメタミンで選抜することで、コンディショナルノックアウト原虫を得た。現在これらをクローニング中であり、完了次第、オーキシシン誘導によりノックアウトができるかどうか検証していく。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>なし</p>

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: June 1, 2023
Project no: 2022-joint-18

1. Principal investigator

Name: Albert Mulenga
Position: Professor of Veterinary Parasitology
Affiliation: Texas A&M University

2. Project title:

Establishment of split Cas9 for functional characterization of essential genes in *Babesia bovis*

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)

01/04/2022 -31/03/2023: one year

5. Purposes and objectives

We aimed to establish an inducible CRISPR/Cas9 system for *B. bovis* to be used for functional characterization of essential genes in this parasite.

6. Outline of research process

The workflow for adaptation of inducible CRISPR/Cas9 consists of the following aims:

1. Construction of splitCas9-expressing plasmid
2. Generation of splitCas9-expressing *B. bovis*
3. Optimization of rapamycin to be used for reassembly of Cas9 fragments
4. Validation of CRISPR/splitCas9 for induction of gene knockout

7. Outline of research achievements

A plasmid construct was generated to express splitCas9 and inserted into *ef-1 α* locus of *B. bovis* genome. PCR assay confirmed the insertion of the plasmid construct into the target locus. To recycle the selection marker, *yFCU* gene was used in the expression plasmid which confers sensitivity to 5-fluorocytosine (5-FC). A growth inhibition assay was conducted using the transgenic parasite to find the optimum concentration of 5-FC for negative selection. The calculated EC₅₀ was 26±1.2 nM for transgenic parasite expressing splitCas9 while no inhibition was seen in wildtype parasite. We used 1µM of 5-FC for negative selection which resulted in selection of parasites that lost the selection marker.

Next, we measured IC₅₀ of rapamycin to optimize the concentration that can be used for Cas9 assembly. A growth inhibition assay was done using wildtype parasite. The calculated IC₅₀ was 13.9±11.6 µM and no inhibition was seen at 1µM which was decided to be used for Cas9 assembly.

To validate CRISPR/splitCas9 for induction of a gene knockout, we targeted BbVEAP (VESA1-export associate protein) which previously was shown to be essential for the parasite growth *in vitro* [1]. A circular plasmid expressing guide RNA and having homologous arms for *bbveap* locus repair was transfected into splitCas9-expressing parasite. Following appearance of transgenic parasites, using PCR we found that *veap* locus was modified before the addition of rapamycin. This could be due to the assembly of Cas9 peptides which may happen during protein synthesis and transport in the cytoplasm. In our construct design, we fused Cas9 C-terminal peptide with a nuclear localization signal which will transport the peptide to the nucleus. Cas9 N-terminal peptide has no signal and is assumed to remain in the cytoplasm. Since Cas9 peptides are expressed using strong *ef-1α* promoter, abundant Cas9 peptides may be assembled and exported to nucleus where the functional holoenzyme produces double-strand break in *bbveap* locus. Recently it was shown in *Toxoplasma gondii* that the addition of nuclear export signal to Cas9 N-terminal may prevent this unwanted assembly before addition of rapamycin [2]. We are planning to modify splitCas9-expressing plasmid by fusing nuclear export signal to Cas9 N-terminal peptide and perform the experiments again.

Altogether, we were able to achieve 3 aims mentioned in the research outline: construction of split-Cas9-expressing plasmid, generation of splitCas9-expressing *B. Bovis*, and optimization of rapamycin to be used for reassembly of Cas9 fragments. The final aim could be achieved by modification of splitCa9-expressing plasmid in future studies.

8. Publication of research achievements

None.

Attach reference materials as necessary.

1. Hakimi, H., et al., *Novel Babesia bovis exported proteins that modify properties of infected red blood cells*. PLoS Pathog, 2020. **16**(10): p. e1008917.
2. Li, W., et al., *A splitCas9 phenotypic screen in Toxoplasma gondii identifies proteins involved in host cell egress and invasion*. Nat Microbiol, 2022. **7**(6): p. 882-895.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 23, 2023

Project no: 2022-joint-19

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:

Establishment of DiCre parasite lineages to study essential aspartyl peptidases of *Babesia*

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)

01/04/2022 -31/03/2023, one year

5. Purposes and objectives

The primary goal of this project is to develop innovative functional genomic tools for tick-borne *Babesia* parasites. Specifically, we aim to create a stable transgenic strain(s) of *Babesia* that expresses the DiCre recombinase. The DiCre conditional recombinase system allows for the functional analysis of essential parasite genes, which cannot be effectively studied using conventional non-inducible knock-out systems. Although this technique has been successfully employed in model species like *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* from the Apicomplexa group, it has not yet been introduced in *Babesia*.

The individual objectives of this project are as follows:

- (i) Designing and cloning *Babesia* plasmid constructs that enable the integration of both Cre subunits into the same genomic locus of selected *Babesia* species.
- (ii) Generating "parental" DiCre parasite line(s) and optimizing the transfection strategy for *Babesia*.
- (iii) Implementing the loxP sites into the parasite using both episomal and intra-genomic approaches to confirm recombinase activity.

(iv) Conducting conditional knock-out experiments on selected *Babesia* target genes.

By achieving these objectives, we aim to advance our understanding of *Babesia* parasites and their associated diseases, ultimately contributing to the development of improved diagnostic and therapeutic strategies.

6. Outline of research process

During our work on this project and the visit of Dr. Sojka to NRCPD-OUAVM between November 6 and November 16, 2022, we prepared the initial version of the plasmid DNA vector containing the complete DiCre cassette for integration into the genome of our *Babesia divergens* strain. This construct was designed in such a way that by making only two changes in the homologous regions, we could use the same plasmid/DiCre cassette for integration into the genome of *Babesia bovis*, a related *Babesia* sensu stricto species that is of relevance to our Japanese collaborators in this project.

However, our subsequent attempts to electroporate and create *B. divergens* parental lineages through serial dilution revealed significant shortcomings in the initial design of the DiCre cassette-holding plasmid, leading to unsuccessful outcomes. Therefore, in 2022, we undertook a redesign and synthesis of a novel version of the DiCre cassette-holding plasmid to enable its integration into both *Babesia* species.

The work was also supported by our parallel CAS/JSPS joint mobility project, when two members of our team, Eliana Fernanda Galindo Cubillos (postdoc) and Ana Maria Osório De Barros De Almeida Filipe (PhD student), visited NRCPD in Obihiro for almost two months. During their internships they primarily focused on generating stable lines of *B. bovis* parasites that express the dimerizable Cre-recombinase (DiCre). This enzyme facilitates the conditional deletion of target genes, allowing for conditional knockdown (iKO). Both visiting researchers acquired practical skills related to the preparation of transgenic *Babesia* and subsequent analysis of the resulting phenotype. Additionally, they received intensive training in various knock-in/out techniques targeting specific genes in *Babesia*, which are crucial for studying gene function in this organism.

The main outcome of their two-month internship was the generation of transgenic strains of *B. divergens*/*B. bovis* carrying the updated version of the DiCre cassette. These strains are currently undergoing cloning by serial dilution and analysis through PCR.

Furthermore, our collaboration with the University of Geneva, Switzerland, regarding recombinant expression, purification, and biochemical characterization of two BdASP3 proenzymes prepared in baculovirus-infected Sf9 insect cells, has continued. Results from this collaboration were presented by team members Sojka, Jalovecká, and Šnebergerová at the International Congresses of Parasitology – ICOPA XV, held in Copenhagen, Denmark, from 21-26 August 2022.

7. Outline of research achievements

- *B. divergens* and *B. bovis* were selected as model organisms.
- Specific promoters for *B. divergens/B. bovis* were identified and their sequences were determined.
- Specific 3' untranslated regions (UTRs) for *B. divergens/B. bovis* were identified and their sequences were determined.
- The sensitivity of *B. divergens* to Blasticidin-S-Deaminase (BSD) and WR99210 selection markers was validated.
- The first and second generation of a plasmid DNA vector containing the full DiCre cassette for incorporation into the genome of *B. divergens/B. bovis* was designed and synthesized.
- Team members were intensively trained in strategies to perform knock-in/out techniques on specific genes in *Babesia* by NRCPD-OUAVM host lab members.
- Transgenic strains of *B. divergens/B. bovis* carrying the updated version of the DiCre cassette were generated. This process involved cloning by serial dilution and integration analyses through PCR.
- Aspartyl proteases recBdASP3a/b, encoded by first-choice DiCre recombinase target genes, were expressed in both *E. coli* and Sf9 insect cells. These expressed proenzymes were then biochemically characterized using Western blots and immunomicroscopy techniques. Antibodies raised against recBdASP3a/b were utilized for these analyses.

8. Publication of research achievements

Due to the COVID-19 pandemic and the closure of Japan's borders for tourism and business travels, the internships of CZ team members in Japan were initially made available only in late 2022. Consequently, there hasn't been sufficient time to publish the obtained results before the deadline of this report. However, we plan to publish the results of the ongoing collaboration between the CAS and NRCPD-OUAVM teams in 2023-2024. These publications will be based on our long-term collaboration, supported by other concurrently running projects.

Attach reference materials as necessary.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: May 21, 2023
Project no: 2022-joint-20

1. Principal investigator

Name: Morakot KAEWTHAMASORN

Position: Associate Professor

Affiliation: Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

2. Project title:

Identification of mosquitoes in goat farms and molecular screening of malaria parasite in mosquitoes.

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, 2022 – March 31, 2023

5. Purposes and objectives

Mosquitoes play a key role in transmitting many infectious diseases including malaria. Ungulate malaria parasites are known to be transmitted by the mosquitoes belonging to the genus *Anopheles*. There have been a few reports about mosquitoes responsible for malaria transmission in mouse deer and white-tailed deer while mosquito vector for goat malaria transmission remains unknown. The objective of this study was to identify the vectors responsible for transmitting the goat malaria parasite, *Plasmodium caprae*.

6. Outline of research process

The mosquitoes were collected from goat farms located in six districts across four provinces in northern and western Thailand. Each location has been visited only once. From each district, one or two specific localities were chosen as follows: Lao Khwan District (14° 28' 33.4" N 99° 48' 25.0" E and 14° 28' 51.1" N 99° 48' 11.7" E) in Kanchanaburi, Wiang Sa District (18° 31' 56.9" N 100° 37' 50.2" E) and Mueang Nan District (18° 49' 07.0" N 100° 46' 36.9" E) in Nan, Ban Kha District (13° 17' 32.3" N 99° 25' 06.8" E) in Ratchaburi, Kaeng Krachan District (12° 53' 45.7" N 99° 42' 45.4" E) in Phetchaburi, and Ban Mai District in Kanchanaburi (13° 53' 27.3" N 99° 37' 16.2" E and 13° 54' 40.8" N 99° 37' 52.4" E). Mosquitoes were sorted out under the stereomicroscope for unfed, blood-fed, half-gravid and gravid status as well as its group or species levels based on pictorial identification key. Then, DNA extraction

was conducted in a pool of 1-3 mosquitoes, followed by screening for *Plasmodium* spp. by PCR. Mosquito species and Plasmodium-positive samples were sequenced for confirmation.

7. Outline of research achievements

A total of 1,019 anopheline and 133 non-anopheline mosquitoes were collected from goat farms in Thailand, where goats infected with *P. caprae* were found. Molecular biological methods targeting the cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1), cytochrome c oxidase subunit 2 (cox2) genes, and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region were used to identify anopheline mosquitoes. To detect *P. caprae*, both pooled and individual mosquitoes were tested using the head-thorax parts containing the salivary glands. Primers specific to three genetic markers, namely cytochrome b, cytochrome c oxidase subunit 1, and 18S small subunit ribosomal RNA genes, were employed. Furthermore, blood samples were collected from goats during the mosquito surveys to determine their malaria infection status. The study unveiled six groups comprising nine mosquito species found on goat farms, namely Hyrcanus, Barbirostris, Subpictus, Funestus, Tessellatus, and Annularis. *Anopheles subpictus* and *Anopheles aconitus* were identified as carriers of *P. caprae* DNA. This marks the first time that *An. subpictus* and *An. aconitus* have been implicated as potential vectors for *P. caprae*.

8. Publication of research achievements

8.1 Nguyen AHL, Nugraheni YR, Nguyen TT, Aung A, Narapakdeesakul D, Kaewlamun W, **Asada M, Kaewthamasorn M. 2023.** Molecular characterization of anopheline mosquitoes from the goat malaria-endemic areas of Thailand. *Med Vet Entomol.* 37(2):381-395. doi: 10.1111/mve.12638.

8.2 Nguyen AHL, Pattaradilokrat S, Kaewlamun W, Kaneko O, **Asada M, Kaewthamasorn M. 2023.** Myzomyia and Pyretophorus series of *Anopheles* mosquitoes acting as probable vectors of the goat malaria parasite *Plasmodium caprae* in Thailand. *Sci Rep.* 13(1):145. doi: 10.1038/s41598-022-26833-4.

Attach reference materials as necessary.

Received: 27 June 2022 | Accepted: 20 December 2022

DOI: 10.1111/mve.12638

ORIGINAL ARTICLE

Medical and Veterinary
Entomology



Molecular characterization of anopheline mosquitoes from the goat malaria-endemic areas of Thailand

Anh Hoang Lan Nguyen^{1,2} | Yudhi Ratna Nugraheni^{1,2,3} | Trang Thuy Nguyen^{1,2} |
Aung Aung^{1,2} | Duriyang Narapakdeesakul^{2,4} | Winai Kaewlamun⁵ |
Masahito Asada⁶ | Morakot Kaewthamasorn²

¹The International Graduate Program of Veterinary Science and Technology (VST), Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

²Veterinary Parasitology Research Unit, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

³Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

⁴Veterinary Pathobiology Graduate Program, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

⁵School of Agricultural Resources, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

⁶National Research Center for Protozoan Diseases, Department of Global Cooperation, Research Unit for Global Infection Control, Obihiro University of Agriculture and Veterinary, Obihiro, Japan

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

Check for updates

OPEN **Myzomyia and Pyretophorus series of *Anopheles* mosquitoes acting as probable vectors of the goat malaria parasite *Plasmodium caprae* in Thailand**

Anh Hoang Lan Nguyen^{1,2}, Sittiporn Pattaradilokrat³, Winai Kaewlamun⁴, Osamu Kaneko⁵, Masahito Asada⁶ & Morakot Kaewthamasorn²

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: June 30, 2023

Project no: 2022-joint-21

1. Principal investigator

Name: Batdorj Davaasuren

Position: Researcher

Affiliation: Institute of Veterinary Medicine

2. Project title:

Investigation of parasitic strategy, especially tissue parasitism of *T. equiperdum* on horse

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Keisuke SUGANUMA

Position: Assistant Professor

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

01/04/2022 – 331/03/2023, 1 year

5. Purposes and objectives

Trypanosoma equiperdum primarily parasitizes the genital organs and causes dourine in equidae. Dourine is considered an economically important disease of horses in Mongolia. In the previous studies, we have collected autopsy samples from naturally infected horse. Autopsy sample from naturally infected horse provide only a window of information about infection at the time of euthanasia and it cannot provide dynamics of infection. Therefore, the objective of this study was to determine the parasitism of *T. equiperdum* by sequential sampling from *T. equiperdum* experimental infection in horses.

6. Outline of research process

1. *T. equiperdum* IVM-t1 strain was experimentally infected to 3 horses.
2. From two days the post infection, the infected horses' basic physiological parameters were measured, and also samples (blood, serum, milk and genital organ's swab) were collected.
3. Parasites were microscopically observed using thin blood smears.
4. DNA were extracted from blood, swab and milk samples.
5. The extracted DNA was analyzed by PCR assay using the parasite specific primers.
6. Serum samples were applied for ELISA and ICT to detect anti-trypanosome antibody.

7. Outline of research achievements

Results:

Horse 1 and Horse 2:

Physiological parameters were normal for 50 days post infection. In those horses, we made the experimental infection with 1×10^5 and 1×10^6 parasites by vagina. There is no detected parasite DNA in the blood and swab of those horses. When I analyze the horse's sera by ELISA and ICT tests which are based on recombinant antigens (rTeGM6), no detected any positive by both methods. Also, I didn't find any parasite from the blood smears.

Horse 3

In this horse, we made the experimental infection with dilution of the parasite 1×10^5 , by vein. For general blood parameters, the number of white cells has increased from 10th day post-infection. This means that inflammation has already developed in the horse. As for the PCR assay in blood samples, the positive bands have detected from the third day of post-infection in the horse. But no detected any positives from swab samples in this horse. Antibody titer has increased a little in the horse from 14th days of post infection was detected by ELISA test. But not detected any positive by ICT test. The antibody titer which against the parasite was increased a little in the horse's serum from 14th days of post infection was detected by ELISA test. But not detected any positive by ICT test and blood smear.

Discussion

In the horse, that only was made an experimental infection with *T. equiperdum* IVM-t1's culture (1×10^5) by vein, was detected as positive on the 3rd day post-infection only in blood by PCR, and at 14th days post-infection in serum by ELISA, respectively. But the ICT test did not show any positives. That means the parasite culture adapted to laboratory environment couldn't survive in vaginal condition compare to natural wild-type, while the culture is only able to survive in blood circle of the horse. The present study is the first time conducted experimental infection in a real host (horse) by the *T. equiperdum* IVM-t1 strain in Mongolia.

8. Publication of research achievements

None

Attach reference materials as necessary.

None