

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

2024年4月9日

採択番号	2023-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	トキソプラズマ分泌性タンパク質と宿主ミトコンドリアの親和性解析		
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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>細胞内小器官の一種であるミトコンドリアは、エネルギーの産生場として働き、様々な真核生物において代謝系を中心に生命活動を支えている。近年の研究では、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の機能も発揮していることが分かってきた。私たちのグループでは、これまでミトコンドリアを介した抗ウイルス自然免疫に関する一貫した研究を行い、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 など)。</p> <p>一方、トキソプラズマに代表される細胞内寄生虫が、哺乳動物へ感染した際の宿主内ミトコンドリアとの関わりについてはこれまでほとんど明らかになっていなかった。そこで本研究では、トキソプラズマ原虫に感染した宿主内で、宿主由来のミトコンドリアがどのような挙動を示すのか? その点を明らかにする研究を行った。特に、トキソプラズマ原虫が感染後に分泌する原虫由来の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、その際の病原性発現との関連性も明らかにしたい。さらに、本研究では原虫側の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も目指した。</p>		
研究経過の概要	<p>私たちの予備実験から、複数種類のトキソプラズマ分泌性タンパク質群が宿主ミトコンドリアと非常に強い親和性を持つことが生化学的な解析により明らかになった(学会発表を参照)。さらに、これらのタンパク質群を個別に培養細胞内で一過性発現させると、宿主由来のミトコンドリアに共局在することも見出した。これらの知見より、本研究では次の研究計画を実施した。</p> <p>(1) 宿主ミトコンドリア結合性トキソプラズマタンパク質(TgGRA25)を恒常的に発現させ</p>		

	<p>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を行い、TgGRA25 と相互作用する宿主側のミトコンドリアタンパク質を同定した。それらの特異的抗体を用いて、免疫沈降実験により、TgGRA25 との相互作用を明らかにした。</p> <p>(2) 受入れ研究室の西川義文教授との共同研究により、TgGRA25 の欠損原虫及び遺伝子入れ戻し株を作製した。それら組換え原虫を用いた細胞への感染実験により TgGRA25 の生理的な役割を明らかにした。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>初めに、特定した宿主ミトコンドリア結合性のトキソプラズマタンパク質 (TgGRA25) の安定発現細胞株を用いてプロテオーム解析を行い、宿主ミトコンドリア側の相互作用タンパク質を網羅的に探索した。これまでの細胞分画やプロテアーゼ耐性実験などの実験結果から、TgGRA25 がミトコンドリア外膜に局在することが確認できたため、私たちはミトコンドリアの外膜タンパク質と TgGRA25 との関わりに着目してその相互作用タンパク質を探索した。その結果、免疫沈降法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できたが、外膜タンパク質群の相互作用は極めて限定的であり、タンパク質間相互作用以外の結合要因も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、私たちはリン脂質との結合解析および人工リポソームを用いてその結合様式について解析した。その結果、TgGRA25 が特定のリン脂質 (特に PA) と特異的に結合することが明らかになった。この脂質との結合性は、リン脂質の脂肪鎖長や不飽和度の違いにも変動することも明らかになった。PA 合成酵素のうち、ミトコンドリア外膜局在型の PLD6 と TgGRA25 が相互作用することは、免疫沈降実験などからも明らかとなり、ミトコンドリア外膜のリン脂質を介した相互作用様式を知ることができた。</p> <p>一方で、野生型および TgGRA25 欠損原虫を Vero 細胞に感染させ、各 24, 48, 72 時間後におけるトキソプラズマの感染率、増殖率、エグレッション率の比較を検討した。免疫染色による結果では、TgGRA25 欠損による宿主への感染率への影響は有意な差としては見られず、増殖率においても大きな差は見られなかった。しかしながら、これら原虫株を用いたプラークアッセイでは、TgGRA25 欠損によりトキソプラズマの増殖が抑制されていることが明らかとなった。さらに、PLD6 高発現細胞では原虫のエグレッション率に有意な変動が見られ、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大いに示唆された。現在、これらの研究成果は原著論文として学術雑誌に投稿中である。</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, 伴匡人, 西川義文, 小柴琢己 「トキソプラズマ原虫と宿主ミトコンドリアの膜リン脂質を介した相互作用」第96回日本生化学会大会 (2023年10月31日) • 錦織充広 「膜リン脂質を介したトキソプラズマ原虫・宿主ミトコンドリア間相互作用の解析」2023年度ミトコンドリア・サイエンス・ワークショップ (2023年9月4日) • 錦織充広, 伴匡人, 西川義文, 小柴琢己 「寄生虫由来タンパク質の宿主ミトコンドリア膜リン脂質への結合」令和5年度日本生化学会九州支部例会 (2023年6月25日)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年3月31日

採択番号	2023-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	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	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	2023年4月1日 ~ 2024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>昨年の報告書に記載した実験結果</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、ウィ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・レーザーアブレーション 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>これらに加え、</p> <ul style="list-style-type: none"> トキソプラズマ感染マウス網膜の電子顕微鏡観察の結果、視細胞のクリステの縮小などフェロトーシスと思われる所見が確認された。 トキソプラズマ感染マウス網膜において GPx4 タンパクの減少が確認された。 		

	<p>などの追加結果を含め、順調に研究は進められ、論文発表された。</p> <p>現在は、特許出願内容をもとに新規検査キット・新規治療薬の共同研究を行う企業を探しており、ベルギーの会社と秘密保持契約の締結を進めている。</p> <p>競争的研究費獲得として科研費基盤 C は継続されている。</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>研究成果の概要</p>	<p>研究成果の一つとして、「研究成果の発表」に記載する論文が受理された。</p> <p>また論文発表に先立って得られた以下の特許出願 特願 2022-178619 【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 出願者: 兼子裕規・西川義文ほか2名 施設: 名古屋大学・帯広畜産大学 は出願完了していたが、今回、JST の支援を獲得し PCT 出願を完了した。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>“Retinal ferroptosis as a critical mechanism for the induction of retinochoroiditis during ocular toxoplasmosis.” Ushio-Watanabe N(3 番目), Nishikawa Y(17 番目), Kaneko H(19 番目).(合計 19 名)(筆頭 3 名は同等貢献) Redox Biol. 2023 Nov;67:102890. doi: 10.1016/j.redox.2023.102890.</p> <p>特願 2022-178619 【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 出願者: 兼子裕規・西川義文ほか2名 施設: 名古屋大学・帯広畜産大学の PCT 出願が完了した。</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年4月22日

採択番号	2023-共同-3		
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	2023年4月1日 ~ 2024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2金コロイド)とホスファチジルセリン(PtdSer)の寄生胞膜での局在を検討し、<i>Toxoplasma gondii</i>原虫の宿主細胞からの脱出機構におけるPtdSerおよびPtdEtnの役割を検討した。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>		

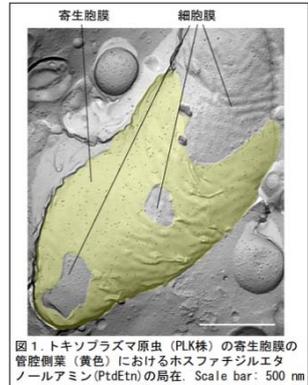


図1. トキソプラズマ原虫(PLK株)の寄生胞膜の管腔側(黄色)におけるホスファチジルエタノールアミン(PtdEtn)の局在。Scale bar: 500 nm

<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、宿主細胞内の <i>Toxoplasma gondii</i> 原虫の寄生胞膜におけるグリセロリン脂質であるホスファチジルセリン (PtdSer, 図1) およびホスファチジルエタノールアミン (PtdEtn, 図2) の微細分布を明らかにした。細胞膜を含む生体膜では、PtdSer および PtdEtn は通常、細胞質側のリーフレット(内葉, P-face) に主に局在する。ところがヒト線維芽細胞(HFF-1)内に寄生する <i>T. gondii</i> 原虫の寄生胞膜では、PtdSer および PtdEtn は内葉と外葉(管腔側リーフレット, E-face)の両方にほぼ同じ密度で局在することがわかった。<i>T. gondii</i> 原虫は寄生膜と宿主細胞の細胞膜を破り、宿主細胞から脱出する。その後、再度、細胞に寄生して増殖を繰り返す。以前の報告では、<i>T. gondii</i> 原虫は、この脱出時に perforin-like protein1 (TgPLP1)を分泌し、寄生胞膜と宿主細胞膜の破壊に役立てることが考えられている¹⁾。さらに、TgPLP1は生体膜の細胞質側の脂質に親和性を持つことを明らかにし、生体膜の破壊に寄与していることが示唆されている。本研究で明らかとなった、前述の PtdSer および PtdEtn が管腔側のリーフレット(E-face)に豊富に存在することは、TgPLP1が選択的に PtdSer あるいは PtdEtn に結合することにより、寄生胞膜の破壊に関係することが強く示唆された(投稿準備中)。</p> <p>1) Guerra, A.J. et al. Structural basis of <i>Toxoplasma gondii</i> perforin-like protein 1 membrane interaction and activity during egress. <i>PLOS Pathogens</i>, 14, e1007476, 2018</p>
<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> 160, 279-291, 2023. doi: 10.1007/s00418-023-02218-0.</p>

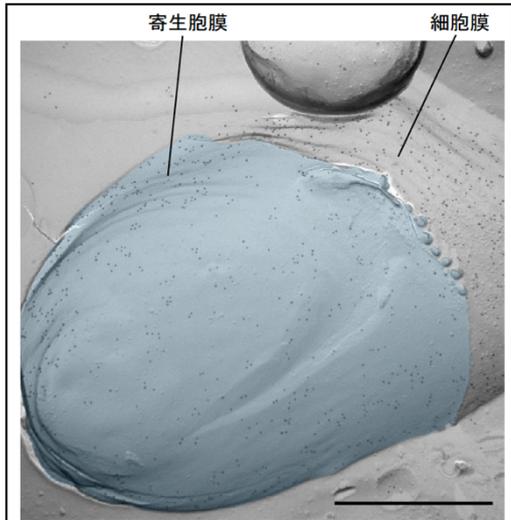


図2. トキソプラズマ原虫 (PLK株) の寄生胞膜の管腔側葉 (青) におけるホスファチジルセリン (PtdSer) の局在. Scale bar: 1 μm

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.15

Project no: 2023-joint-4

1. Principal investigator

Name: Kishor Pandey

Position: Associate Professor

Affiliation: Central Department of Zoology, Institute of Science and Technology, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal

2. Project title:

Molecular characterization and genetic diversity of tick-borne diseases in Nepal

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)

01/04/2023 -31/03/2024: one year

5. Purposes and objectives

Tick-borne diseases cause significant morbidity and mortality in animals in Nepal. Piroplasm is one of the important protozoan parasites in the cattle. There have been very few studies about tick-borne parasitic diseases in Nepal. Those studies were focused on the detection of tick-borne parasites using microscopy. There were no molecular studies on tick-borne parasites in Nepal. The objective of this study was to detection of tick-borne parasites in cattle in Nepal using molecular methods.

6. Outline of research process

The blood samples were collected from cattle in three districts (Kathmandu, Lalitpur, and Bhaktpur) of Kathmandu Valley, Nepal. Thin blood smears were prepared, fixed with methanol, and stained with Giemsa solution. The smears were observed under a microscope for the detection of blood parasites. Then, DNA was extracted from each cattle blood sample, followed by PCR targeting piroplasm-specific primers. PCR-positive samples were further confirmed by sequencing.

7. Outline of research achievements

The study was conducted to detect the types of piroplasm affecting cattle in the Kathmandu Valley, Nepal using molecular methods. In this hospital-based study, 106 blood samples were collected from cattle that were brought to the hospital for proper diagnosis of blood-borne disease infections. Thin

blood smears were prepared and observed under the microscope. Similarly, blood samples were used for DNA extraction. PCR and sequencing were performed to detect and identify piroplasm present in the collected samples. This study revealed that 45 (42.5%) were positive for piroplasm (*Babesia* spp. and *Theileria* spp.) via microscope observation and 56 (52.8%) samples were positive via PCR. We were able to identify the species as *B. bigemina*, *B. bovis*, *T. annulate* and *T. orientalis* by PCR followed by sequencing. Nine samples were selected and performed for sequencing. The phylogenetic analyses of those sequenced samples showed that the *B. bovis*, *B. bigemina* and *T. orientalis* sequences belonged to each species clade. On the other hand, *T. annulate* was divided into two clades in the analysis, and our *T. annulate* sequences were also divided into these two clades. The result is the first to detect piroplasm using PCR techniques in Nepal.

8. Publication of research achievements

Dhakal M, Gompo TR, Devkota P, Kafle SC, Subedi JR, Gong H, Arima H, Culleton R, **Asada M, Pandey K**. Molecular detection and Identification of piroplasm in cattle from Kathmandu Valley, Nepal. *Pathogens*. 5;12(8):1045.

Attach reference materials as necessary.

> [Pathogens](https://doi.org/10.3390/pathogens12081045). 2023 Aug 15;12(8):1045. doi: 10.3390/pathogens12081045.

Molecular Detection and Identification of Piroplasm in Cattle from Kathmandu Valley, Nepal

Medhavi Dhakal ¹, Tulsi Ram Gompo ², Prakash Devkota ², Sharmila Chapagain Kafle ², Janak Raj Subedi ¹, Haiyan Gong ³, Hiroaki Arima ⁴, Richard Culleton ⁵, Masahito Asada ⁶, Kishor Pandey ¹

Affiliations – collapse

Affiliations

- 1 Central Department of Zoology, Institute of Science and Technology, Tribhuvan University, Kathmandu 44601, Nepal.
- 2 Central Veterinary Laboratory, Kathmandu 44600, Nepal.
- 3 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China.
- 4 Department of International Health and Medical Anthropology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki 852-8523, Japan.
- 5 Division of Molecular Parasitology, Proteo-Science Centre, Ehime University, Ehime, Matsuyama 791-0295, Japan.
- 6 Research Unit for Global Infection Control, National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月31日

採択番号	2023-共同-5		
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・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	
	のるえいでいん 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	
	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	
	すずき かな 鈴木 伽奈	東京農工大学大学院生物システム応用科学府・大学院生	
	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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>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ピテロジェニン(Vg)の合成が制御されることが判明している。</p> <p>そこで本研究では、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。</p>		

<p>研究経過の概要</p>	<p>2021 年度には、ミヤコカブリダニのゲノム全塩基配列のショートリードシーケンシングが完了した。2022 年度には、ロングリードシーケンシングも完了し、ショートリードとのハイブリッドアセンブリにより高品質なゲノム情報を構築した。</p> <p>このゲノム情報をもとに、2023 年度からは、RNA-Seq による比較トランスクリプトーム解析や RNAi による機能解析に取り組んだ。比較トランスクリプトーム解析に加え、比較プロテオーム解析も実施した結果、当初予定していた Vg 遺伝子や TOR 経路で機能する遺伝子群だけでなく、栄養条件に応じて顕著に発現量が変化する複数の遺伝子が同定された。</p> <p>そこで 2023 年度は、その遺伝子の中の一つであるミヤコカブリダニのトリアシルグリセロールリパーゼ (triacylglycerol lipase, NcTAGL) 遺伝子を標的とした機能解析について、発現レベル以外に、捕食量や産卵数など生理学的解析も進めた。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>通常状態と飢餓状態のミヤコカブリダニ間でのトランスクリプトームおよびプロテオームの比較解析より、飢餓状態における NcTAGL の遺伝子およびタンパク質の顕著な発現減少が確認された。TAGL はエネルギー源として体内に貯蓄されているトリアシルグリセロール (TAG) を加水分解し、遊離した脂肪酸が β 酸化とクエン酸回路を経て ATP が産生される。血リンパ中の脂肪酸のレベルは摂食行動の制御因子でもあるため、NcTAGL 遺伝子の RNAi によって飢餓様状態を誘導できる可能性がある。そこで、ミヤコカブリダニの NcTAGL 遺伝子に対する二本鎖 RNA (dsNcTAGL) の経口投与による RNAi 誘導試験を実施した。</p> <p>その結果、dsNcTAGL 摂取 12 h 後に NcTAGL 遺伝子の発現量は低下し、RNAi の有効性が認められた。一方、dsNcTAGL 摂取 72 および 120 h 後では、予想に反して NcTAGL 遺伝子の発現量は上昇した。この原因として、NcTAGL 遺伝子の一時的な発現抑制に、上流因子 (転写因子など) が応答して、NcTAGL 遺伝子の発現を促進するフィードバック調節が生じた可能性がある。</p> <p>ここで、昆虫では、中腸細胞内で発現するリパーゼの上流因子として神経ペプチド F (Neuropeptide F, NPF) や NPF 受容体 (NPFR) が知られている。ミヤコカブリダニにおける NPFR のホモログ (NcNPFR) 遺伝子の発現量を解析した結果、dsNcTAGL 摂取 72 および 120 h 後において、NcNPFR 遺伝子の発現量の有意な上昇が確認された。これは、NcTAGL 遺伝子の RNAi に応答し、NcNPFR を介したフィードバック調節が生じた可能性を示唆する。</p> <p>他方、dsNcTAGL 摂取個体における捕食行動や産卵数に有意な影響はみられなかった。</p> <p>今後は、NcTAGL の上流因子として機能する可能性が示唆された NcNPFR 遺伝子の発現抑制による NcTAGL 遺伝子の発現変動や表現型に加え、NcNPF 遺伝子の発現変動も調査し、これら遺伝子による脂質代謝の恒常性維持のためのフィードバック調節機構の解明を進めていく必要がある。このフィードバック調節機構が解明され、そこで機能する遺伝子をゲノム選抜における分子マーカーとして利用すれば、高い捕食圧と定着率を兼ね備えたミヤコ系統の作出が期待できる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>【国際会議での発表】</p> <p>Takeda, N., K. Kataoka, Y. Arai, K. Suzuki, K. Yura, and T. Suzuki (2023) The draft genome of the predatory mite, <i>Neoseiulus californicus</i>: Pesticide resistance and feeding behavior. 13th Spider Mite Genome Meeting, Logrono, La Rioja, Spain, September 11 to 14, 2023 (口頭、招待講演)</p>

【国内学会での発表】

武田直樹, 新井優香, 片岡孝介, 由良敬, 白藤 (梅宮) 梨可, N.A. Ghazy, 森光太郎, 刑部正博, 日本典秀, 鈴木丈詞 (2024) ミヤコカブリダニのゲノム全塩基配列解読とピリダベン抵抗性因子の推定. 日本昆虫学会第 84 回大会・第 68 回日本応用動物昆虫学会合同大会, 仙台, 2024 年 3 月 28-31 日 (ポスター)

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月16日

採択番号	2023-共同-6		
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	マラリア原虫オーシスト形成・分化に関する分子機構の解明:壁構成蛋白質の探索から		
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 筏井 宏実	北里大学獣医学部・教授 研究総括	
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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>マラリア原虫はオーシスト形成時に媒介蚊と相互作用する事により、オーシスト壁という特殊な構造物を形成する。</p> <p>本研究は、マラリア原虫のオーシスト形成・分化に関する分子機構の解明を目的とし、オーシスト形成期における、①オーシスト壁構成蛋白質の探索、②それらオーシスト壁構成蛋白質の発現動態および機能解析、③原虫オーシスト形成期のトランスクリプトーム解析、④オーシスト形成抑制ワクチン抗原への応用検討を行なう事によって、媒介蚊体内における原虫オーシスト形成期に関する生物学的特徴を明らかにすることを目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>本研究はネズミマラリア原虫 (<i>Plasmodium berghei</i> GFP 発現組換え原虫) とハマダラカ (<i>Anopheles stephensi</i>) を用いて、研究を実施した。</p> <p>ハマダラカに、<i>in vitro</i> 培養したネズミマラリア原虫のオーキネートを血体腔にインジェクションを行い感染させた。インジェクションしたハマダラカの血体腔から浮遊したオーシストを合計 2,077 個回収した。回収したオーシストは、膜タンパク質の粗精製として凍結融解を実施し、ショットガンプロテオミクス解析を行った。その結果、<i>P. berghei</i> タンパク質 197 個が同定され、これらの中には、PbCap380 など既知のオーシスト壁構成タンパク質が含まれていた。これら同定されたタンパク質から、オーシスト壁を構成し、且つ物質輸送に関連すると推測される候補タンパク質を 8 種類選出した。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>選出した候補タンパク質 8 種類について、それぞれペプチド抗体の作製を試み、7 種類の候補タンパク質についてそれぞれペプチド抗体が得られ、1 種類の候補タンパク質については現在作製中である。</p> <p>作製された 7 種類のペプチド抗体は、感染血の吸血により中腸に形成されたオーシストを用いて免疫蛍光染色法を実施し、その局在を調べた。7 種類のペプチド抗体すべて、オーシストでの発現が確認された。これら 7 種類のうち 4 種類について、共焦点レーザー顕微鏡観察により局在の詳細を調べたところ、1 種類はオーシスト壁に、2 種類はオーシスト壁およびその内膜に、1 種類はオーシスト壁内膜には局在していることが明らかとなった。他の抗体に関しても、引き続き局在解析は実施していく予定である。</p> <p>さらに、インジェクションした雌雄ハマダラカを用いて次世代シーケンズを行い、その遺伝子発現変動からハマダラカにおける原虫保有数を規定する分子候補を選別した。これら候補遺伝子に関しては、siRNA 等を用いた解析を引き続き実施していく予定である。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>原口麻子, 平田るりこ, 中山和彦, 箱崎純, 中村咲蓮, 草木迫浩大, 筏井宏実, 第 93 回日本寄生虫学会大会(順天堂大学), <i>Plasmodium berghei</i> の新規オーシスト壁構成タンパク質の探索, 2024 年 3 月 9 日</p> <p>原口麻子, 高野真, 箱崎純, 中山和彦, 中村咲蓮, 吉川泰永, 福本晋也, 草木迫浩大, 筏井宏実, 第 46 回日本分子生物学会年会(神戸ポートアイランド), ハマダラカのマラリア原虫感染に対する新たな応答分子の探索, 2023 年 12 月 6 日</p> <p>Kodai Kusakisako, Asako Haraguchi, Kazuhiko Nakayama, Jun Hakozaki, Sakure Nakamura, Hiromi Ikadai, The 21st Protein Island Matsuyama International Symposium (PIM2023) (愛媛大学), Investigation of novel <i>Anopheles</i> mosquitoes-derived responsive factors against <i>Plasmodium</i> infection, 2023 年 9 月 13 日</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月23日

採択番号	2023-共同-7		
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・招聘研究員 活性化化合物の精製・構造決定	
	かみひら りえ 神平 梨絵	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	
	あきづき こうた 秋月 孝太	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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>トリパノソーマ症に対する現行の治療薬は薬剤耐性株の出現や副作用などの問題が指摘されているため、依然として新たな治療薬開発には高いニーズがある。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。</p> <p>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、抗トリパノソーマ活性スクリーニングを行い、ヒットサンプルから活性本体を探索する。また、植物由来の抗トリパノソーマ活性を有する天然化合物の探索を行う。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活性試験を担当する。</p>		
研究経過の概要	<p>大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿 (S07140) から得られた <i>T. evansi</i> および <i>T. congolense</i> に対して強い抗原虫活性 (IC₅₀ = 0.60, 0.61 μg/mL) を示す新規アルカロイドについて、立体化学を含めた構造の詳細な解析を行っている。また、原虫内での薬剤の局在を特定するための傾向プローブ分子および標的タンパク質の同定のためのプローブ分子の合成を行っている。</p> <p>長崎県産の海綿 <i>Siliquariaspongia japonica</i> からは、新規の抗リーシュマニア原虫活性化化合物として、aurantoside L (IC₅₀ 0.74 μM) を得た。</p> <p>薬用植物としても知られる春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> について、活性本体の探索を行った結果、coronararin D のほか複数の抗トリパノソーマ活性を有する新規成分が得られた。これらについて MS スペクトルならびに NMR スペクトルを測定し、得られたスペクトルを解析することで 5 種類の新規抗トリパノソーマ活性化化合物の構造を明らかにした。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿(S07140)から単離した新規化合物については、これまで報告されている活性化化合物とは異なる構造モチーフを与えるものであったため、米国特許仮出願を行った。</p> <p>現在トリパノソーマ原虫感染マウスを用いて、<i>in vivo</i> 抗原虫活性試験を行っている。ここで有効な <i>in vivo</i> 活性が認められたら、特許の本出願の手続きを進める。また、合成したプローブ分子をビーズに結合させ、トリパノソーマ原虫抽出物から標的分子をつり上げ、プローブ分子に結合したタンパク質について SDS-PAGE および MS/MS 解析を行って、各標的候補タンパク質を同定する。得られた標的タンパク質候補の情報をもとに、パスイ解析を行って作用メカニズム解析を行う。</p> <p>長崎県産の海綿 <i>Siliquariaspongia japonica</i> からは、新規の抗リーシュマニア原虫活性化化合物として、aurantoside L (<i>L. amazonensis</i> IC₅₀ 0.74 μM)を得た。本化合物はトリパノソーマ <i>T. congolense</i> に対する抗原虫活性は示さなかった。</p> <p>埼玉産春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> 抽出物から、<i>T. congolense</i> に対する抗トリパノソーマ活性成分の探索を行った。<i>C. aromatica</i> の抽出物を溶媒分画に付し、得られた活性画分を各種クロマトグラフィーを用いて活性成分を精製した。得られた複数の活性成分について、MS スペクトルおよび NMR スペクトルを測定した。得られたスペクトルをもとに構造解析を行って、活性本体として coronarin D (IC₅₀=1.5 μM)ならびにその新規類縁体 (IC₅₀=9.0 μM)、4 種類の新規ジアリールヘプタノイドダイマー (IC₅₀=6.1~10.4 μM) を同定した。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>(論文発表)</p> <ol style="list-style-type: none"> Oyadomari, Y.; Goto, Y.; Kawazu, S.; Becking, L. E.; Fusetani, N.; Nakao, Y. Aurantioside L, a New Tetramic Acid Glycoside with Anti-Leishmanial Activity Isolated from the Marine Sponge <i>Siliquariaspongia japonica</i>, <i>Marine Drugs</i>, 22, 171, (2024). https://doi.org/10.3390/md22040171 <p>(学会発表)</p> <ol style="list-style-type: none"> 秋月孝太, 菅沼啓輔, 伊藤駿, 高橋伶奈, 中村文彬, 河津信一郎, 中尾洋一, 『大島新曾根産海綿に含まれる新規アルカロイドの構造と生物活性』, 第 65 回天然有機化合物討論会, 東京, 2023 年 9 月 15 日. Oeda, K.; Suganuma, K.; Nakamura, F.; Nakao, Y. “Anti-trypanosomal Terpenoids from Wild Turmeric, <i>Curcuma aromatica</i>” 13th International Symposium on Bioorganic Chemistry (IsBOC-13), シンガポール, 2023 年 12 月 18 日. Akizuki, K.; Suganuma, K.; Ito, S.; Takahashi, R.; Nakamura, F.; Kawazu, S.; Nakao, Y. “Structure and Biological Activity of a Novel Alkaloid from the Marine Sponge <i>Theonella</i> sp.” 13th International Symposium on Bioorganic Chemistry (IsBOC-13), シンガポール, 2023 年 12 月 18 日. Oyadomari, Y.; Goto Y.; Suganuma, K.; Kawazu, S.; Becking, L. E.; Fusetani, N.; Nakao, Y. “A New Tetramic Acid Glycoside with Anti-Leishmanial Activity Isolated from a Japanese Marine Sponge <i>Siliquariaspongia japonica</i>” 13th International Symposium on Bioorganic Chemistry (ISBOC-13), シンガポール, 2023 年 12 月 18 日. <p>(特許)</p> <ol style="list-style-type: none"> 発明の名称:A novel alkaloid compound with anti-trypanosomal activity from Oshima-shinsonne sponge、出願日:令和 5 年 8 月 24 日、発明者:中尾洋一、中村文彬、秋月孝太、菅沼啓輔、出願番号:PCT/ US 63/578,496、出願人:学校法人早稲田大学、国立大学法人帯広畜産大学

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月15日

採択番号	2023-共同-8		
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	トキソプラズマの保有する2つのアクアポリン分子が関与する病原性発現機構		
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人獣共通感染症学研究室・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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	トキソプラズマはこれまで、「水チャネル」であるアクアポリン分子を2種類持つことが知られている。本研究は、申請者が最近発見した事象である、「2つのアクアポリン分子の欠損によるトキソプラズマ病原性の著しい減弱」を掘り下げ、そのメカニズム解明を目的とする。		
研究経過の概要	<p>実験 1</p> <p>トキソプラズマ Pru Δ Ku80 株を親株とし、相同組換え法によって作出された TgAQP1 と TgAQP2 のそれぞれのノックアウト原虫株について、C57BL/6 マウスに腹腔内投与し、その病原性を評価した。</p> <p>実験 2</p> <p>トキソプラズマ Pru Δ Ku80 株を親株とし、相同組換え法によって TgAQP1 と TgAQP2 の両方をノックアウトしたダブル KO 原虫株: Δ TgAQP1 Δ TgAQP2 株について、そのマウスに対する病原性を同様に感染実験によって評価した。</p> <p>実験 3</p> <p>それぞれの株の生体内における増殖、シスト形成効率を評価するため、各株感染マウスの脳を破碎し、形成シスト数を計数した。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>結果</p> <p>TgAQP1 と TgAQP2 のそれぞれのノックアウト原虫株 (ΔTgAQP1 株、ΔTgAQP2 株)の作出に成功した。</p> <p>これらをマウスに腹腔内接種した結果、いずれの KO 株も病原性はやや減弱した。そこで、両方の AQP をノックアウトしたダブルノックアウト原虫 ΔTgAQP1 ΔTgAQP2 株を作出し、その病原性を検討した結果、マウスへの病原性が顕著に減弱することを明らかにした (図 1)。</p> <p>各株感染マウスの脳を破砕し、形成シスト数を計数した結果、ΔTgAQP1 ΔTgAQP2 は親株および単独欠損株に比べ、シスト数が少ない傾向がみられた。</p> <p>図 1 各株のマウスに対する病原性</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

2024年5月20日

採択番号	2023-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	組換えアクアポリンを用いた抗マダニワクチンの構築		
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	2023年4月1日 ～ 2024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 AQP ペプチドをモルモットに免疫することによって、マダニ AQP を標的とした抗マダニワクチンとしての可能性を検討す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 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。吸血節足動物の吸血行動においてアクアポリン(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。一方で、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、AQP ペプチドを用いた抗マダニワクチンとしての可能性について検討することを目的とした。</p> <p>2. 材料と方法 ①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 AQP の特性を解明するために、AQP 遺伝子の同定および</p>		

	<p>AQP の分子特性を解析した。また、AQP の分子特性および AQP 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。さらに、RNA 干渉法による AQP 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 AQP の役割について検討した。</p> <p>②AQP ペプチドによる免疫実験</p> <p>我々は AQP のアミノ酸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、AQP 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。そのため、MODELAGON による抗体に対する AQP のエピトープ予測を行った。次に、AlphaFold2 によるエピトープとなりうる AQP ペプチドの予測構造の解析を行った。これらの解析結果に基づいて、ワクチン抗原として相応しい 2 種類の AQP ペプチドを合成した。合成された AQP ペプチドはモルモットに 3 回免疫を行い、抗血清を回収した。得られた抗血清については、AQP ペプチドおよびフタゲチマダニの抽出抗原に対する抗体価を測定した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>3. 結果</p> <p>①フタゲチマダニにおける AQP 遺伝子の同定および AQP の分子特性</p> <p>フタゲチマダニの唾液腺の cDNA ライブラリーから完全長 AQP cDNA を得、塩基配列解析を行ったところ、3,341 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 N-型糖鎖結合部位が存在することが推定された。</p> <p>②フタ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</p> <p>フタゲチマダニの臓器における AQP 遺伝子の発現動態を調べたところ、AQP 遺伝子発現レベルは、中腸では未吸血期と緩慢吸血期で高く、急速吸血期から徐々に低下した。唾液腺では吸血開始から徐々に上昇し、急速吸血期をピークに徐々に低下した。マルピーギ管では急速吸血期まで発現は低く、飽血時に急激に上昇した。</p> <p>RNA 干渉法による AQP 遺伝子発現の抑制を行ったところ、飽血時体重、産卵準備期間、卵重量/飽血時体重、卵期には有意な差は認められなかった。しかし、AQP 遺伝子抑制群のマダニを解剖したところ、コントロール群に比べて、体の黄色化、中腸の直径減少、マルピーギ管の直径の減少、外皮の軟化、中腸と直腸囊の脆弱化、成熟卵母細胞数の減少、異常な形態の卵母細胞の出現、ジェネ氏器官の形態異常が観察された。</p> <p>③AQP ペプチドに対する抗体価の変化</p> <p>2 種類の AQP ペプチドに対する抗体価の変化を調べるために、ELISA を行ったところ、AQP(AQP#122-132)および(AQP#202-214)に対する各々の抗体価は、免疫後上昇した。しかし、各々の AQP から得られた抗体はマダニ抽出抗原に対する反応性は弱かった。</p> <p>4. 考察</p> <p>AQP 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、AQP 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。一方、免疫した AQP ペプチドに対する抗体価の上昇は確認できたが、マダニ抽出物に対する抗体の反応性は弱かった。この原因として、全タンパク量中の AQP の含量および AQP ペプチドの構造が、実際の AQP 構造を模倣していないことによる影響も推測された。今後は抗 AQP 抗体を用いて、唾液腺、中腸、マルピーギ管、卵巣における AQP の局在を調べることで、AQP の詳細な特性解明が期待される。</p>

研究成果の 発 表	学会発表 佐藤萌子, 佐藤成子, 水野寛太, <u>田仲哲也</u> , 玄 学南, 鈴木宏志, 白藤(梅宮)梨可, フ タトゲチマダニにおけるアクアポリンの機能解析, 第 32 回日本ダニ学会大会, 北海道立 道民活動センターかでの 2・7, 2023 年 9 月(北海道)
--------------	--

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月28日

採択番号	2023-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	白藤 梨可
研究課題名	高増殖型マダニ細胞の作出		
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	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	
	にわ しほ 丹羽 志萌	北海道大学獣医学部・学部学生	
	かただ ゆき 片田 雪	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	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニはウイルス、細菌、原虫など様々な病原体を媒介するため、多くの感染症研究分野で研究対象となっている。マダニに由来する細胞はマダニ媒介性病原体の分離やその性状解析にとって有用な実験ツールである。しかしながら、本邦を含めたアジア地域に優占するチマダニ属マダニの細胞が開発されていないことが、研究遂行の大きなボトルネックとなっている。本研究では、フタゲチマダニなどの国内の重要チマダニ属マダニ種の細胞作出を目的とした。マダニ初代培養細胞の作出時に、化合物や人工基質を培地に添加することで、マダニ細胞の高増殖化を試みた。</p>		
研究経過の概要	<p>【マダニ細胞材料】 実験室マダニ維持株(フタゲチマダニ、キチマダニ、ヤマアラシチマダニ)および野外採集株(フタゲチマダニ、タカサゴチマダニ)を実験に用いた。雌成ダニをウサギに吸血させ、飽血マダニを得た。25度のインキュベーター内で飼育し、産卵させた。発育卵を経時的に観察し、産卵後約21日後に卵塊を回収し、細胞作出材料とした。</p> <p>【マダニ初代培養細胞の調整】 マダニ卵塊の表面を滅菌したのちに、ハンドホモジェナイザーを用いて乳剤を作製した。ハンクス平衡塩類溶液を用いて複数回の洗浄し、卵殻構成物等を除去した。L-15培地をベースとした培養液中に、抗真菌剤、抗生物質、ビタミン類を添加し、マダニ乳剤を懸濁した。初代培養細胞は、28度または32度で静置し、増殖をモニタリングした。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>【マダニ細胞増殖モニタリング】 マダニのアクチンタンパク質をコードする遺伝子の保存領域にプライマーを設計し、その遺伝子発現を RT-PCR 系により評価した。また、株化マダニ細胞では、増殖に従って培地の pH が低下することが報告されている。RT-PCR による活性評価に加えて、培地の pH を測定した。</p> <p>【高増殖化マダニ細胞の作出試験】 マダニの高増殖化を目的に、①染色体の分裂阻害剤の添加、②人工基質の添加、という2つ方法を試みた。</p> <p>① 染色体の分裂阻害剤の添加実験 これまで開発され広く用いられている株化マダニ細胞では染色体の異数性が観察されている。本実験では、上述のマダニ初代培養細胞の作成時に、染色体分配を阻害することが知られている 2 種の化合物を複数の濃度で添加し、マダニ細胞の増殖をモニタリングした。その結果、化合物1添加群では非添加群と比べて遺伝子発現強度に有意な差はみられなかった。一方、化合物2添加群では、添加濃度が高いロットほど、遺伝子発現強度が高い傾向にあった。培地の pH 変化については、全ての群間で有意な差は得られなかった。</p> <p>② 人工基質の添加試験 マダニ細胞は、接着系と浮遊系の多様な細胞種が混じり合った形で増殖することが報告されている。また、細胞濃度が低い状態では、容易に細胞死につながるものが観察されている。そこでヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) のフィーダーフリー培養などにも有効性が示されているハイドロゲルの人工基質を培地に添加して、上述の手法でマダニ初代培養細胞を作出した(図1)。RT-PCR 系による遺伝子発現解析、培地の pH 測定の両方で、人工基質の添加群と非添加群の間に有意な差はみられなかった。</p> <div data-bbox="826 1025 1372 1388" data-label="Image"> </div> <p>図1. ハイドロゲルを用いた人工基質の添加試験</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

2024年5月27日

採択番号	2023-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	マラリア原虫のスポロゾイト形成における Brca2 の機能		
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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>マラリア原虫は蚊が吸血した際に雌雄ガメートサイトが雌雄ガメートとなり接合する。そして減数分裂を行い、中腸の基底膜にオーシストを形成して、次世代のスポロゾイトを形成する。</p> <p>マラリア原虫において相同組換えは減数分裂時の組換え反応や DNA 二本鎖切断時の相同組換え修復に必須な機構なので、マラリア原虫においても重要な機構である。我々は、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に注目し、研究を行ってきた。この研究の過程でマラリア原虫では Brca2 は雌ガメートサイトへの分化に貢献していることが推測された。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、および、ネズミマラリア原虫における DNA 損傷に対する Brca2 の機能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から分与いただいた EGFP を発現するマラリア原虫に Brca2 のアミノ酸配列の一部を強制発現するマラリア原虫の作製を試みている。</p> <p>1月に貴研究センターを訪問した際に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>研究成果の 概 要</p>	<p>Brca2 のドメインの機能解析</p> <p>前回の共同研究における成果として 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alaria原虫 Brca2 のどの領域がスポロゾイト形成に必要であるか解析するために Brca2 のドメインの一部をクローニングし、野生型ネズミマalaria原虫に導入する計画を考えた。現在までにマalaria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alaria原虫にトランスフェクトすることを試みているが、成功までには至っていない。</p> <p><i>in vitro</i>での DNA 結合解析</p> <p>ネズミマalaria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構築し、現在組換えタンパク質の発現および精製を試みている。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>本研究課題に関わる成果発表は未だ行っておりません。</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月30日

採択番号	2023-共同-12		
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	2023年4月1日 ~ 2024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。また、子宮 $\gamma\delta T$ 細胞の誘導・維持機構についても検証する。</p>		
研究経過の概要	<p>昨年度、妊娠中に <i>Toxoplasma gondii</i> を感染させると、$\gamma\delta T$ 細胞欠損マウスでは分娩異常による死亡が起きること、<i>T. gondii</i> の胎児への垂直感染が増加することを見出していた。本年度は $\gamma\delta T$ 細胞が妊娠中の <i>T. gondii</i> 感染から母子を保護するメカニズムの解析を進めた。</p> <p>また、子宮 $\gamma\delta T$ 細胞が母体の共生細菌依存的に維持されていることを見出したことから、$\gamma\delta T$ 細胞誘導細菌の探索を進めた。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>SPF 環境下で飼育したマウスと無菌環境下で飼育したマウスの比較から、子宮 $\gamma\delta T$ 細胞が母体の共生細菌依存的に維持されていることを見出したことから、スペクトラムの異なる種々の抗生物質を投与する実験、および、無菌マウスに候補細菌を移植するノバイオート実験を実施し、責任細菌の特定を進めた。また子宮 $\gamma\delta T$ 細胞の維持に関わるものが期待された複数のパスウェイについて遺伝子改変マウスを用いて検証を行った。</p> <p>子宮 $\gamma\delta T$ 細胞が <i>T. gondii</i> 感染から母子を保護するメカニズムを明らかにするために、母子境界面に位置する胎盤における <i>T. gondii</i> の量を調べたところ、野生型マウスと $\gamma\delta T$ 細胞欠損マウスで有意な差は認められなかった。したがって、$\gamma\delta T$ 細胞は <i>T. gondii</i> の排除ではなく、<i>T. gondii</i> 感染に伴う組織傷害の抑制や、組織修復の促進に関わっている可能性がある。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p>The 51st Naito Conference にて発表予定 (採択済み)</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月21日

採択番号	2023-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	2023年4月1日 ~ 2024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 M1 アミノペプチダーゼ阻害剤 PBT を見出した。PBT は、MCF 同様にペプチド由来の天然化合物である。</p> <p>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>PBT は、トキソプラズマに対して有効な抗原虫活性を示さなかった。さらに、PBT は重症化マラリア感染モデルに対して有効な抗原虫作用を示した。従って、PBT は、マラリア原虫のアミノペプチダーゼにより特異的に作用することが考えられ、今後の抗マラリア薬のリード化合物候補として期待が持てる(Ariefta NR et al. AAC. 2023)。</p> <p>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、MCF だけでなく PBT も次世代の新規マラリア薬の発展に繋がるのが期待できる。</p> <p>抗原虫剤 MCF の抗原虫作用において、これまでに我々の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、トキソプラズマ原虫の小胞体、ゴルジ体周辺オルガネラを可視化し、MCF の作用点を突き止めるために各々の局在マーカー抗体を調製し、間接蛍光抗体法で共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。</p> <p>MCF の原虫に対する作用点を考える上で、重要な Sar1GTPase に対するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)の小胞体局在化シグナル KDEL を認識するレセプターと考えられる Erd2 ホモログ2種類に対する抗体、小胞体シャペロン BiP, PDI, その他、HSP70, 90 の抗体を調製し観察に用いた。その結果、Sar1GEF が一方の Erd2 と共局在することが明らかとなった。その局在性は、核周りに存在するトキソプラズマの小胞体のパターンと言うよりドット状のパターンを示した。おそらく、ゴルジ体に近い部位もしくはゴルジ体に局在する可能性が示された。現在、ゴルジ体マーカーに対する抗体を調製し、さらに解析を進める予定である。</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. Leessombun 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. 6. Arieftha NR, Pagmadulam B, Hatano M, Ikeda N, Issiki K, Matoba K, Igarashi M, <u>Nihei C</u>, Nishikawa Y. Antiplasmodial Activity Evaluations of a Bestatin-related Aminopeptidase Inhibitor, Phebestin. <i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy.</i> 67 (7):1-14. 2023.
----------------------	---

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月30日

採択番号	2023-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	福本 晋也
研究課題名	北海道における海獣由来トキソプラズマの単離培養法の確立と全ゲノム解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	ひこさか けんじ 彦坂 健児	千葉大学大学院医学研究院感染生体防御学・准教授	
研究分担者	こばやし まり 小林 万里	東京農業大学生物産業学部・教授	
	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	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>本研究の目的は、海棲哺乳類に寄生するトキソプラズマを分離培養することで、その全ゲノムによる系統解析及びマウス感染による病原性の評価を可能とし、海棲哺乳類が有する本原虫の感染動態を明らかにすることである。海洋におけるトキソプラズマ感染の報告は、鰭脚類や鯨類などの海棲哺乳類、魚類、軟体動物、甲殻類などに散見される。しかし、そのほとんどが抗体検査による疫学調査の報告であり、遺伝子型などの分子系統学的情報は極めて少ない。また、ラッコを対象とした大規模なトキソプラズマ感染の調査では、陸上のネコ科動物では同定されずラッコでのみ同定される遺伝子型が検出されている。以上より、海洋環境において陸上とは異なった独自の原虫生態系を形成している可能性が考えられ、本研究で得られる原虫生態系情報は公衆衛生・野生動物保護対策の立案に貢献することが期待できる。</p>		
研究経過の概要	<p>今年度は 65 頭のゼニガタアザラシを用い、以下の 1～3 の項目について研究を実施した。</p> <p>1. PCR によるトキソプラズマ感染状況の調査</p> <p>研究開始当初は、ヒトのトキソプラズマ PCR 検査で用いられている B1 遺伝子を標的とした PCR を実施したが、条件検討の結果、当研究室で設計した <i>cox1</i> 遺伝子を標的とした PCR の方が検出感度は高く、シーケンスによる種同定にも使えることから、検出方法を <i>cox1</i>-PCR に変更した。PCR に用いる鋳型 DNA は、捕獲したゼニガタアザラシ 65 頭のうち、23 頭からは血液のみ、42 頭からは脳、心臓および血液を採取し、それぞれの試料から抽出したものを使用した。PCR およびシーケンスの結果、65 頭中 10 頭(15.4%)でトキソプラズマ特異的配列が同定された。また、PCR 陽性試料より抽出した DNA を用い、種分類に利用される ITS1 領域の塩基配列を決定したところ、こちらもトキソプラズマ特異的配列であることが確認された。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>2. マウスを用いたトキソプラズマ株の樹立 ゼニガタアザラシ 20 頭(うち 6 頭は心臓が PCR 陽性)の心臓のホモジネートを作成し、それぞれの試料を 8 週齢の ICR マウス 1 匹ずつ計 20 匹に経口投与した。その後、感染経過を 2 ヶ月間観察した。20 匹中 2 匹のマウスは途中で斃死したため、トキソプラズマの PCR 検査を実施したが、原虫 DNA は検出されなかった。残りのマウスについては、脳を分離しホモジネートを作成後、検鏡によりシストの有無を観察したが、シストは検出されなかった。2023 年度のマウス感染実験においてトキソプラズマの感染は確認されなかったが、次年度は、より新鮮な試料の使用、シスト保存温度の検討などを行い、マウス感染によるゼニガタアザラシ由来トキソプラズマ株を樹立したいと考えている。</p> <p>3. ELISA によるゼニガタアザラシ血清中の抗トキソプラズマ抗体検出系の確立 PCR 法による原虫 DNA の検出方法では検出に使用するサンプル量が微量であるため、PCR 陰性の場合でもトキソプラズマに感染しているかどうか判断がつかない場合がある、そのため、ELISA による抗トキソプラズマ抗体の検出を併用することとした。抗原は、地球規模感染症学分野の玄学南教授より供与を受けたトキソプラズマ表面抗原である SAG2 の遺伝子を発現するプラスミドを用い精製した。現在、トキソプラズマ感染/非感染マウスの血清を用いた ELISA 検出系の条件検討を行っており、次年度にはゼニガタアザラシの血液試料を用いた抗トキソプラズマ抗体保有調査が可能となる予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>彦坂健児, Chen F Xue, Bai Jingrun, 松崎素道, 坂本寛和, 小林万里, 福本晋也. 北海道のゼニガタアザラシにおけるトキソプラズマの感染調査. 第 93 回日本寄生虫学会大会(ポスター発表), 2024 年 3 月, 東京.</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年5月21日

採択番号	2023-共同-15		
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	河津 信一郎
研究課題名	ヒストン修飾酵素阻害剤によるマラリア原虫増殖阻害とその分子基盤の解明		
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	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	本研究では、マラリア原虫の増殖メカニズムを明らかにするために、原虫のヒストンへの化学修飾に着目し、研究を展開している。具体的には、ヒストンの化学修飾を行う酵素を阻害する化合物ライブラリーを独自に調整し、それらを用いてマラリア原虫のすべてのライフステージ(赤内期・肝内期・昆虫体内期)における増殖阻害評価を行う。そして、各発育ステージ間における感受性の差異を明確にし、マラリア原虫のライフサイクル間における、ヒストン化学修飾に関連した増殖制御メカニズムの全貌を明らかにすることを試みる。		
研究経過の概要	申請者の所属する研究室では、すでに独自に調整した、マラリア原虫ヒストン修飾阻害酵素阻害化合物全 200 種類のライブラリーを用いた実験を開始している。赤内型原虫では、ネズミマラリア原虫 (<i>Plasmodium berghei</i> : Pb)、熱帯熱マラリア原虫 (<i>P. falciparum</i>)、サルマラリア原虫 (<i>P. cynomolgi</i>) の増殖阻害効果を確認しており、前年度の共同研究報告書にて報告している。また、熱帯熱マラリア原虫を用いて、ガメトサイト(生殖母体)のみをターゲットとした殺原虫効果の解析も行っている。その結果、ガメトサイト特異的に効果を示す化合物の存在を明らかにしており、赤内型内でもステージ特異的なヒストン修飾酵素の役割の違いが示唆された。そこで、本研究ではガメトサイト期の次のステージである「昆虫体内型」における増殖阻害効果を検討した。昆虫体内型原虫の薬物評価実験系は、化合物を加えたスクロースを事前に給餌させたハマダラカに、Pb 感染血液を吸血させ、14 日後にハマダラカ中腸内のオーシスト数や形態観察を行うことで阻害効果を評価する。		

<p>研究成果の概要</p>	<p>また、感染させる Pb は Luciferase を発現する株を用いることで、Luciferase アッセイにより、オーシストの増殖阻害効果を Luciferase のシグナルとして数値化することが可能である(図1)。</p> <p>本研究の薬剤評価に使用した化合物は、ガトサイトへ殺滅効果が非常に高かった化合物 SE1・SE2・SE3 を選定した。ネガティブコントロールとしては、DMSO を摂取させた群と感染血を吸血させない 2 群を設定した。結果、大変驚いたことに、ガトサイトでは非常に強い殺原虫効果を示した 3 化合物であったが、Pb の昆虫体内型では全く効果を示さないことが明らかとなった(図2)。SE1・SE2 は、先の実験にて Pb の赤内型にも非常に強い増殖阻害効果を示していることが明らかとなっている。以上の結果を踏まえると、本結果は、原虫種によるヒストン修飾酵素の違いによるものではなく、マalaria原虫は増殖ステージ特異的にヒストンの修飾を制御していると示唆された。</p> <p>現在、赤内型で増殖阻害効果のあった化合物に関しても、昆虫体内型での検討を行っている。また、肝内型への効果も順次解析を開始しており、本研究の遂行により各発育ステージ間における感受性の差異を明確にし、マalaria原虫のライフサイクルにおける、ヒストン修飾に関連した増殖制御メカニズムの全貌を明らかにすることを試みる。</p> <div data-bbox="367 851 1412 1198"> </div>
<p>研究成果の発表</p>	<p>論文発表</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Araki T, Koyama A, Yoshimura H, Arai A, Kawai S, Sekizawa S, Umeki Y, Saito-Nakano Y, Imai T, Okamoto M, Sato M, Thabthimthong W, Kemthong T, Hisaeda H, Malaivijitnond S, Annoura T*. Ultrasensitive malaria detection system for Anopheles mosquito field surveillance using droplet digital PCR. <i>Parasitol Int.</i> 2024 Mar 26;101:102891. doi: 10.1016/j.parint.2024. 102891. 2. Tateishi YS, Araki T, Kawai S, Koide S, Umeki Y, Imai T, Saito-Nakano Y, Kikuchi M, Iwama A, Hisaeda H, Coban C, Annoura T*. Histone H3.3 variant plays a critical role on zygote-to-oocyst development in malaria parasites. <i>Parasitol Int.</i> 2024 Jun;100:102856. doi: 10.1016/j.parint.2024.102856.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年6月7日

採択番号	2023-共同-16		
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	ウシバベシア原虫赤内期必須遺伝子の同定に向けた 次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の構築		
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・特任研究員 (現:酪農学園大学獣医学類医動物学ユニット)	
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	2023年4月1日 ~ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p><i>Babesia bovis</i> はウシ赤血球内に寄生する原虫であり、感染宿主に発熱、貧血、血色素尿といった症状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。バベシア原虫は全長 8.2Mbp からなる 4 つの染色体に約 3700 個のタンパク質をコードしているが、有用な薬剤やワクチン標的候補抗原の網羅的な探索は未だなされていない。この問題を解決するために感染宿主へ病原性を示す赤内期における原虫の遺伝子必須性を明らかにするハイスループット(HiT)スクリーニングシステムが必要であると考えた。申請者はバベシア原虫と同様に赤血球へ寄生するネズミマラリア原虫において HiT-CRISPR スクリーニング系の開発に成功している。本共同研究では、この手法をバベシア原虫へと応用することで次世代型 CRISPR スクリーニング基盤の開発を目的とする。</p>		
研究経過の概要	<p>HiT-CRISPR スクリーニングに用いるプラスミドのサイズを小さくして遺伝子効率の向上及び、プラスミドクローニングの簡便化を目的として Cas9 発現バベシア原虫の作製を試みた。</p> <p>また、遺伝子組換えに必要な最小相同配列鎖の長さ、及び最少必要プラスミド量についても検討した。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>Cas9 発現原虫作製に必要な最小相同配列鎖の構築及び Cas9 発現カセットを挿入する原虫遺伝子領域に関して決定した。当該プラスミドは作製済みであり、2024 年度に遺伝子組換え原虫の作出を原虫病研究センターと酪農学園大学それぞれで実施する予定である。</p> <p>遺伝子組換えに必要な最小相同配列鎖の長さ及び最少必要プラスミド量の検討実験に使用するプラスミドも作製済みである。5 μg のプラスミド量を用いて実施した組換え実験では、遺伝子組換え原虫を得ることができなかった。この結果は申請者がネズミマラリア原虫を用いて得た結果とは異なっており、その原因として使用する機器の違いが推測された。そこでネズミマラリア原虫の遺伝子組換えに使用した Nucleo factor 4D を用いたバベシア原虫の遺伝子導入プロトコルの最適化を 2024 年度に実施する。当該機器は既に購入済みであり、現在はバベシア原虫の移管手続きを行っている段階である。移管後に条件の最適化実験を速やかに実施した後に、2023 年度に作製したプラスミドを用いて最小相同配列鎖と最少必要プラスミド量の最適化実験を進める。</p> <p>また、ネズミマラリア原虫の HiT-CRISPR スクリーニングに関する研究成果は bioRxiv へ投稿し、現在査読を受けている。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<p><プレプリント></p> <p>1. T.K. Jonsdottir, M.S. Paoletta, <u>T. Ishizaki</u>, S. Hernandez, M. Ivanova, A.H. Curbelo, P.A. Saiki, M. Selinger, D. Das, J. Henriksson, E.S.C. Bushell. A scalable CRISPR-Cas9 gene editing system facilitates CRISPR screens in the malaria parasite <i>Plasmodium berghei</i>. bioRxiv, 2024.</p>

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2024年4月5日

採択番号	2023-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	菅沼 啓輔
研究課題名	漢方薬構成生薬－特に黄芩・黄耆のフラボノイド類－の 原虫病への応用を志向した構造活性相関研究		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	むらた としひろ 村田 敏拓	東北医科薬科大学薬学部・准教授	
研究分担者	なりた こういち 成田 紘一	東北医科薬科大学薬学部・講師	
	こんの たいすけ 金野 太亮	東北医科薬科大学薬学部・助教	
	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	2023年4月1日 ～ 2024年3月31日		
目的・趣旨	<p>これまでに展開した国際共同研究で、外国資源から多様な天然由来抗トリパノソーマ活性化化合物を多数見出した実績と知見を基盤とし、本課題では応用実現性を視野に、使用実績があり材料確保や安全性の観点から有利な漢方薬を構成する日本薬局方収載生薬に着目する。従来の研究の経緯から、局方生薬の黄芩（オウゴン）と黄耆（オウギ）のフラボノイド類を対象を絞り、合成により化学的多様性を創出して構造活性相関研究を展開する。また獣医学領域での漢方薬・生薬の応用可能性を検討する。</p>		
研究経過の概要	<ol style="list-style-type: none"> 「黄芩（オウゴン）」と「黄耆（オウギ）」のフラボノイドを対象とした成分探索を行った。これまでの継続的な課題として進めてきた「オウゴン」と同属のモンゴル国 <i>Scutellaria scordiifolia</i> から抗トリパノソーマ活性フラボノイドを見出したことから（2023年2月発表）、「オウゴン」中のバイカレインなど関連化合物について定性・定量し、当課題期間内に情報収集を行った。 漢方薬を構成する実際に販売され流通する生薬40種類を所定の溶媒にて成分抽出し、それぞれ化合物の性質ごとに分面を行うことで4～5通りの試料を作製した。これら試料について、優先順位を付けた上で、抗トリパノソーマ活性試験、抗セリンプロテアーゼ試験を行った。 化学合成によるフラボノイドの構造多様性創出の試みとして、1で述べた <i>Scutellaria</i> 属植物フラボノイドの全合成を試みた。現時点で全合成は達成されていないものの、関連化合物をいくつか得ることができ、抗トリパノソーマ活性試験を実施した。 漢方薬・生薬の獣医学領域での使用実績の初期調査の準備を行った。 		

<p>研究成果の概要</p>	<p>経過 1 の成果</p> <p>生薬「オウゴン」由来の試料については、いくつかの画分にわたって複数種のトリパノソーマに対して生育阻害活性が認められた。一方で、マメ科植物イソフラボノイドで着目した「オウギ」や「シンギ」はエキスの段階で有力な活性は認められなかった。オウゴンの成分としては、オウゴニンやクリシンなど <i>Scutellaria</i> 属に共通するフラボン類が抗トリパノソーマ活性を示すことを見出しており、これらが画分中の活性本体成分であることが推察された。</p> <p>経過 2 の成果</p> <p>今回、評価に用いた生薬由来試料のうち、「オウゴン」以外にもいくつかの生薬の特定の画分に抗トリパノソーマ活性が認められた。これらの試料が、「オウゴン」由来エキスやその活性フラボンと同様の機序で活性を示すのかどうかは現時点ではわからないが、今後複数種の試料の組合せにより活性が増強するか、また個々の作用メカニズムはどのようなものかを追求する必要がある。</p> <p>経過 3 の成果</p> <p>現時点で目的物質の (<i>S</i>)-2-(2', 5'-dihydroxyphenyl)-5,7,8-trihydroxychroman-4-one の合成は達成できていないが、関連化合物としてフラバノン骨格を持つ目的物質に近い構造の化合物をいくつか合成することができた。構造活性相関の検討を行うために、これら関連化合物についても抗トリパノソーマ活性を評価している。</p> <p>経過 4 の成果</p> <p>調査用アンケートを作成し、これに係る倫理指針と個人情報の適正な取扱方法など必要手続き書類を東北医科薬科大学倫理審査委員会に提出して承認された。また東北医科薬科大学研究分担者と帯広畜産大学獣医学研究部門研究者とで、医薬品を動物に使用した時の薬物動態学的研究について連携を図ることとなった。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>Phytochemical investigation of <i>Scutellaria scordiifolia</i> and its trypanocidal activity. S. Nurbyek, B. Buyankhishig, K. Suganuma, Y. Ishikawa, M. Kutsuma, M. Abe, K. Sasaki, B.-O. Davaasuren, J. Batkhuyag, T. Murata. <i>Phytochemistry</i>, 209, 113615 (2023).</p> <p>内容: シソ科植物 <i>Scutellaria scordiifolia</i> から抗トリパノソーマ活性フラボノイドを新規イリド配糖体類とともに見出した。また生薬オウゴン <i>S. baicalensis</i> と本種について、特徴的フラボノイドの HPLC 分析による含有量の比較を行った。</p>

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.24
Project no: 2023-joint-18

1. Principal investigator

Name: Dr Sanjay KUMAR

Position: Principal Scientist

Affiliation: ICAR-National Research Centre on Equines, Hisar 125 001. Haryana. India

2. Project title:

Genetic diversity of *Theileria equi* infecting equines in India and quantification of parasite loads

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Dr. Naoaki YOKOYAMA

Position: Professor

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

01/04/2023 -31/03/2024: one year

5. Purposes and objectives

Theileriosis is an economically important, tick-transmitted protozoan disease of livestock. The disease can cause high mortality rates of 70% to 80% in susceptible animals. In India, equine theileriosis caused by *Theileria equi* is widespread, causing severe economic losses. Therefore, control of equine theileriosis is vital in this country. However, lack of understanding the role of carrier animals in the *T. equi* epidemiology is a stumbling block for designing the control strategies in India. Despite the low parasitaemia in latently infected equines, *T. equi* can be tick-transmitted from these carrier animals to naïve animals, where the infection may result in severe clinical theileriosis. Therefore, detecting the carrier animals and estimating the parasite loads are important for the risk assessment and effective management of equine theileriosis, using the available resources in India.

The strategies to control equine theileriosis will be more effective, if they consider the genotypic diversity of *T. equi*. In common with other hemoprotozoan parasites, *T. equi* is genetically diverse, and consists of five genotypes, including genotypes A-E. The merozoite surface antigens, which have been frequently used to develop several diagnostic assays, are highly diverse among the *T. equi* genotypes, sometimes leading to false negative diagnostic test results. For example, the EMA-1, based molecular and serological assays, is found in the genotype A, but not in the genotype C. Therefore, assessment of the genetic diversity of *T. equi* is important for selecting diagnostic assays in the endemic countries. Additionally, the genotype A of *T. equi* is reported to be more commonly associated with clinical theileriosis, as compared to the other genotypes. Similarly, recent studies found that repeated

treatment with anti-theilerial drugs may clear the genotype A from the infected horses, but not the genotype C. Therefore, a comprehensive understanding of *T. equi* genetic diversity is vital for designing effective disease control programs. In India, however, the genetic diversity of *T. equi* has not been fully investigated, rendering the control methods less effective.

Therefore, the proposed study has been designed to investigate the genetic diversity of *T. equi* infecting equines in India and to determine the parasite loads in equines with latent infection.

Objective

To study genetic diversity of *Theileria equi* infecting equines in India and quantify the parasite loads in carrier animals using a qPCR assay.

6. Outline of research process

Materials and Methods

Blood sampling: Blood samples were collected from 84 equines bred in two Indian states, including Haryana (n=28) and Rajasthan (n=56), into EDTA-coated vacuum tubes. DNAs were extracted from the blood pellet using a commercial kit. From each animal, blood samples were also collected into plain tubes without any anti-coagulants, and sera were obtained. Both the DNA and serum samples were then stored at -20°C until further use.

ELISA: An EMA-2-antigen-based ELISA that we had developed in our laboratory at the NRCE was used to screen all 84 sera for detecting antibodies against *T. equi* (Kumar et al., 2013. Vet Parasitol. 198, 10-7.). Final ELISA OD₄₉₂ cutoff point was determined by calculating the relative percent positivity (RPP). Samples showing RPP >20 considered as positive.

PCR detection of *T. equi* and its genotypes: All of the 84 equine blood DNA samples were initially screened using a *T. equi*-specific PCR assay (Alhassan et al., 2007. Vet Parasitol. 143, 155-60.). The positive samples were further analyzed with PCR assays specific to genotype A – E (Ahedor et al., 2023. Parasit & Vectors. 16, 435.).

7. Outline of research achievements

Of 84 samples tested, 42 (50.0%) were positive for *T. equi*-antibodies with RRP values ranged from 67 % to 189%. On the other hand, 27 samples (32.1%) were positive for *T. equi* infection in the screening PCR assay. These 27 *T. equi*-positive samples were further analyzed with the genotype-specific PCR assays. We found that the surveyed equines were infected with the genotypes A and D of *T. equi*. In brief, 7 and 5 equines had single infections with genotypes A and D, respectively, while the remaining 15 were co-infected with the genotypes A and D. The present study is the first to report the *T. equi* genotype D in India, highlighting the potential challenges associated with the management of equine theileriosis. With the results obtained from this collaborative research, we are currently in the process of cultivating the genotype D *in vitro* to explore its diagnostic, clinical, and therapeutic implications.

8. Publication of research achievements

In Progress

Attach reference materials as necessary.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.27
Project no: 2023-joint-19

1. Principal investigator

Name: Consuelo Almazán

Position: Adjunct Professor

Affiliation: Immunology and Vaccines Laboratory (LINVALS), College of Natural Sciences, Autonomous University of Queretaro. Queretaro, Mexico.

2. Project title:

Detection and surveillance of *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901) in Mexico

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Rika Umemiya-Shirafuji

Position: Associate Professor

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

01/04/2023 -31/03/2024: one year

5. Purposes and objectives

Since the first report on 2017 in New Jersey, US, the Asian tick *Haemaphysalis longicornis* has been detected in at least 18 states from North America. This tick is exotic in Mexico. However, in 2019 it was detected on a horse that was entering the country. The horse was originally from Texas, US, and the tick was detected during the inspection point of Coahuila, in the border of US-Mexico. Due to this finding, special attention to inspection of imported live animals is being paid in all ports of entry to the country. Because of the rapid distribution and range extension of *H. longicornis* towards the US southern states, and the free crossing of wild animals that may be carrying the tick, the risk of entrance and establishment of longhorned tick in the country is very high. Furthermore, predicting models performed by Raghavan et al. (2019), have shown that areas from southeastern US to central and southern Mexico are environmentally suitable for development and future distribution of *H. longicornis*. Finally, because climate change affects the distribution of ticks, it is very likely that *H. longicornis* will continue migrating to the south. Early detection of ticks is critical to prevent their establishment and to implement control measures against these parasites and the diseases they transmit. For this early detection, surveillance studies are required. Therefore, **the objective of this project is to establish methods of rapid detection and surveillance of *H. longicornis* tick by morphological and molecular identification** following training and collaboration with researchers at the National Research Center for Protozoan Diseases (NRCPD) in Obihiro, Japan.

6. Outline of research process

Tick collection and Identification

A preliminary collection of ticks attached to wild animals and domestic animals, in collaboration with wildlife and livestock associations as well as animal health authorities working at the inspection points in Northern Mexico has been performed. In addition, a collection of questing ticks from three geographical points in three states from Northern Mexico (Tamaulipas, Nuevo Leon, and Coahuila) by using the tick dragging method has been performed. Collected ticks were preserved in 30 % ethanol and transported to the Laboratory of Immunology and Vaccines (LINVAS), University of Queretaro (UAQ), for identification.

Morphological identification of ticks has been performed according to established guides (Barker & Walker, 2014). In addition, ticks images from different developmental stages obtained from a colony maintained at the Tick-BioBank from the NRCPD, in Obihiro University, Japan (Umemiya-Shirafuji *et al.* 2022) were used.

Genetic studies

Because none of the identified ticks corresponded to *Haemaphysalis* spp., genetic studies have not been performed. However, tick collection and surveillance will continue, and if *Haemaphysalis* ticks are detected, molecular identification and sequencing of 10S rDNA, 12S rDNA, and CoxI genes.

7. Outline of research achievements

- A collection of ticks on domestic and wild animals and in the environment has been performed. Ticks have been morphologically identified and are kept at the LINVAS for future studies.

- On February 2024, I visited the National Research Center for Protozoan Diseases (NRCPD) in Obihiro, Japan, where I took a training on identification and manipulation of *H. longicornis* ticks at the Tick-BioBank under Dr Rika Umemiya-Shirafuji. A series of images of ticks were obtained and these images are used as reference for morphological identification of ticks collected in Mexico.

-The images are included in a document to be used for Veterinarians and other professionals involved in animal health and tick control to prevent incursions and infestations of *H. longicornis* in Mexico.

8. Publication of research achievements

A manuscript written in Spanish is under review. The main objective of this manuscript is to contribute with information on *H. longicornis* biology, life cycle, and provide useful identification for morphological identification of this tick that is not available in Mexico. The published document will be used for Veterinarians and other professionals involved on animal health and tick control in the country. The title of the manuscript is: **The Asian tick *Haemaphysalis longicornis* (Neuman, 1901): Actions to prevent its incursion and establishment in Mexico**, authors: Almazán C, Umemiya-Shirafuji R, Rosario-Cruz R, Cortés García B, Mosqueda J.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.25
Project no: 2023-joint-20

1. Principal investigator

Name: Elisha Chatanga

Position: Lecturer

Affiliation: Lilongwe University of Agriculture and Natural Resources, Malawi

2. Project title:

Molecular detection and genetic characterization of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses and donkeys in Malawi.

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Naoaki Yokoyama

Position: Professor

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

01/04/2023 -31/03/2024: one year

5. Purposes and objectives

The purpose of this study was to detect and genetically characterize *Babesia caballi* and *Theileria equi* infecting donkeys and horses in Malawi. Secondly, our study aimed at identifying the vector ticks of *B. caballi* and *T. equi* in Malawi.

The specific objectives were to 1) detect *B. caballi* and *T. equi* in blood samples collected from donkeys and horses, using microscopy and species-specific PCR assays, 2) identify the genotypes of *B. caballi* and *T. equi*, and 3) identify the tick vectors transmitting *B. caballi* and *T. equi* to donkeys and horses in Malawi.

6. Outline of research process

Research in Malawi

Blood sampling: Blood samples were collected from a total of 185 equines, consisting of 178 donkeys and 7 horses, using EDTA-coated vacutainer tubes in Dedza and Lilongwe districts in central Malawi.

Preparation of blood smears: Thin blood smears were prepared from all of the 185 samples collected. The blood smears were fixed with methanol, and then stained with Giemsa.

DNA extraction: Approximately 125 µL of blood from each animal was transferred onto an FTA card, and allowed to dry at room temperature. The genomic DNA samples were then extracted from the FTA cards, and preserved at -20°C until use.

The prepared blood smears and DNA samples were then transferred to National Research Centre for Protozoan Diseases (NRCPD) at the Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan.

Research at the NRCPD

Microscopy: Blood smears were observed under a light microscope for detecting *T. equi* and *B. caballi* parasites within the infected erythrocytes.

PCR screening: The DNA samples were subjected to previously described *T. equi*- and *B. caballi*-specific PCR assays.

Genotyping of *T. equi*: The DNA samples that had tested positive for *T. equi* in the screening PCR assay were analyzed with the type-specific PCR assays for detecting the genotypes of *T. equi*.

Cloning, sequencing, and phylogenetic analyses: Amplicons obtained from the *T. equi* genotype-specific PCR assays were randomly selected, cloned, and then sequenced. The resultant sequences were subjected to phylogenetic analysis to verify the PCR results.

7. Outline of research achievements

The present study analyzed a total of 185 equines bred in Malawi for the infections of *T. equi* and *B. caballi* using microscopy and PCR. The microscopy results showed that 91 (49.2%) animals were positive for *T. equi*, but none for *B. caballi*. Our results from the PCR assays demonstrated that 156 (84.3%) animals were positive for *T. equi* infection. In contrast, all surveyed animals were PCR-negative for *B. caballi*. Subsequently, the *T. equi*-positive DNA samples were screened with the type-specific PCR assays for detecting the *T. equi*-genotypes A, B, C, D, and E. We found that the surveyed equines were infected with all five genotypes (A – E) of *T. equi*. Our findings indicate that the infection of *T. equi* is common among equines in Malawi, highlighting the need for strategies to control equine piroplasmiasis in this country. Our findings additionally imply that such control strategies should be developed in light of the genotypic diversity of *T. equi*.

A manuscript summarizing these findings and research achievements has been prepared and will soon be submitted for publication in a peer-reviewed scientific journal. With the necessary permission, I transferred some of the reagents acquired for this project to Malawi, where they will be used for my future research activities and capacity building. As the next step, we have planned to collect tick

samples from the equine farms investigated in this study, in order to identify the tick vectors capable of transmitting *T. equi* in Malawi.

8. Publication of research achievements

In progress

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2024.5.23
Project no: 2023-joint-21

1. Principal investigator

Name: RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.

Position: Research Scientist – Laboratory of Molecular Biology of Ticks

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)

01/04/2023 -31/03/2024, one year

5. Purposes and objectives

The primary objective of the 2023 NRCPD OUAVM Joint Research Proposal was to advance our previous collaborative efforts from 2019 and 2022. In these earlier projects, we successfully developed a transgenic *Babesia bovis* parasite lineage expressing the DiCre recombinase, which enables rapamycin-controlled excision of loxP-flanked DNA sequences. This technology facilitates the functional analysis of essential parasite genes, previously demonstrated in model species such as *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. The 2023 proposal aimed to leverage the stable DiCre parasite lineages of *Babesia divergens/bovis* to perform conditional knockouts of aspartyl proteases BdASP3a (023140) and BdASP3b (006490) of the C clade of apicomplexan aspartyl proteases, which are analogous to plasmepsins X/IX for *Plasmodium falciparum* and thus represent the potential master regulators involved in invasion and egress during *Babesia*'s asexual blood stages. Project aimed at phenotypical characterization of the ASP3a/b deleterious phenotypes, with the aim to validate the critical roles of these enzymes in the erythrocytic lifecycle of *Babesia*. This work builds up on our preliminary findings with plasmepsin X/IX and TgASP3 specific inhibitor 49c, supporting Bd/BbASP3 as promising drug targets for *Babesia* control.

The individual objectives of this 2023 joint project were as follows:

- (i) verification of the Cre/lox recombination in novel DiCre Babesia lineages using episomal loxP sites holding plasmids
- (ii) use of the DiCre transgenic *Babesia divergens/bovis* lineages to create conditional knock-outs (iKO) of BdASP3a/b proteases
- (iii) validation of BdASP3a/b as essential and druggable proteases
- (iv) phenotypization - determination of their specific roles in invasion/egress of host erythrocytes during Babesia RBC cycle
- (v) biochemical characterization of recombinantly expressed BdASP3a/b

By achieving these objectives, we aimed to advance our understanding of Babesia parasites and the associated disease, ultimately contributing to the development of improved therapeutic strategies.

6. Outline of research process

In line with the proposed plan, we utilized the extended year of the project to obtain cloned populations of DiCre *Babesia bovis* and *Babesia divergens*. During our work on this project and the visit of Dr. Sojka to NRCPD-OUAVM between October 6-16, 2023, we improved the design and prepared novel version of the DiCre holding cassette for the integration into the *Babesia bovis* genome using homology-based recombination. 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 divergens*, a related *Babesia sensu stricto* species that is of relevance for us back in the Czech laboratory at IoP BC CAS. PCR confirmed the correct integration of plasmids into parasite genomes, and expression of DiCre recombinase subunits was confirmed via quantitative PCR. Additionally, control GFP/mCHERRY holding plasmid vectors were prepared for episomal control of LoxP site excision by the DiCre recombinase in both *Babesia* species and the Cre/lox excisions are currently being confirmed by transfection of these plasmids to *B. bovis* / *B. divergens* DiCre lineages. The final plasmid for BdASP3 iKO containing the floxed *bdasp3* gene sequence was designed and prepared. The ASP3 iKO plasmid transfection will be performed upon the successful Cre/lox episomal excision tests. Resulting iKO BdASP3a/b lineages will serve for the induction of *bdasp3a/bbasp3b* gene excision by rapamycin treatment and subsequent phenotypic observations will be performed.

The work was parallelly supported by the CAS/JSPS (2021-23) joint mobility project. This enabled one member of the Czech team. Ms. Pavla Šnebergerová (PhD student of Dr. Sojka) visited NRCPD in Obihiro for a short internship of two months during October-November 2023. Oppositely, the PhD student of Dr. Asada, Atefe Fathi completed a 7-week long internship supported by the JSPS as part of the project at IoP BC CAS, Ceske Budejovice, Czechia in November-December 2023. During both exchange visits/internships the students primarily focused on generating stable lines of *B. bovis* parasites that express the dimerizable Cre-recombinase (DiCre). Both visiting students further acquired practical skills related to the design and preparation of loxP holding plasmid cassettes and the

preparation of transgenic *Babesia* and subsequent analysis of the resulting ASP3 deleterious phenotype. Additionally, and the associated biochemical and immunostaining work as a part of the biochemical characterization of babesia ASP3 enzymes. Furthermore, we completed the characterization of the two *BdASP3* isoenzymes recombinantly expressed as C-terminal 6x(His) tagged proteins in insoluble form in *E. coli* DE3. This is in contrast with previous plans of expression of these isoenzymes in baculovirus infected insect cells as this method was successful, but we had been observing issues with insufficient recombinant protein yields and their overall instability. The *E. coli* expressed ASP3 proteins were further purified and refolded via step-down dialysis from 8 M urea denaturing buffers and served as active proteases in kinetic assays with fluorescent peptidyl substrates. Inactive mutants of both enzymes were also prepared for large-scale production to obtain protein 3D structures via protein crystallography. All the listed results obtained in 2023 will be part of a forthcoming publication in a high impact factor journal by the end of 2024, with P. Šnebergerová as the first, and Dr. Sojka as the last and corresponding author.

Additionally, our findings were presented at several international conferences in 2023. Dr. Sojka made two active contributions at the 15th International Symposium on Ticks and Tick-borne Diseases in Weimar, Germany, presenting on 'Proteasome inhibitors effectively combat ticks as well as transmitted pathogens' and 'Clade C aspartyl proteases in *Babesia divergens* and their validation as novel drug targets.' Furthermore, at the 12th General Meeting of the International Proteolysis Society in Singapore, our team presented a poster on 'Deciphering the roles of *Babesia* Plasmepsin X/IX homologues and their validation as druggable targets.' Dr. E.F.G. Cubillos also presented at the Fourth International Babesiosis Meeting at Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA.

7. Outline of research achievements

- we successfully obtained cloned populations of DiCRE *Babesia bovis* and *Babesia divergens*
- we PCR confirmed their integration to the parasite genome
- we confirmed the expression of DiCre recombinase
- we prepared loxP-flanked GFP/mCHERRY holding plasmid vectors for episomal control of LoxP site excision by the DiCre recombinase in both *Babesia* species
- we designed and prepared the final plasmid for *BdASP3* iKO using the DiCre approach
- we transfected the parental *B. divergens/B. bovis* DiCre lines with the recipient DNA plasmid containing the loxP-flanked *bdasp3* gene sequence
- we prepared *dASP3a/b* DiCRE lineages by serial dilutions
- we verified the Cre/lox excision and perform phenotyping
- In parallel, we successfully expressed *BdASP3a/b* isoenzymes as C-terminal 6x(His)-tagged proteins in *E. coli* and we are using them for 3D structure studies using protein crystallography

8. Publication of research achievements

By the end of 2023, we published our first joint publication: Cubillos, E. F. G., Snebergerova, P., Borsodi, S., Reichendorferova, D., Levytska, V., Asada, M., Sojka, D., & Jalovecka, M. (2023). Establishment of a stable transfection and gene targeting system in *Babesia divergens*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *13*, 1278041. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1278041>).

Attach reference materials as necessary.