

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

2025年3月31日

採択番号	2024-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	フェルトーシスを標的としたトキソプラズマの新規診断・治療法開発		
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	
	いとう せいな 伊藤 聖奈	名古屋大学医学部医学系研究科眼科・実験補佐員	
	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	2024年4月1日 ~ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>フェルトーシスは2012年に提唱された細胞死の新概念であり、鉄(Fe)の関与を特徴とし、またこれを阻害することによって細胞死を抑制できる可能性がある。研究代表者らが2023年の本申請で計画した内容に対し、トキソプラズマ感染における網膜障害・脳障害におけるフェルトーシスの関与を国際誌に発表し(<i>Redox Biology</i>, 2023:研究成果1を参照)、さらに国内特許出願およびPCT出願(JST支援)を予定より早期に完了した。新規目標は、現時点で論文発表されていない脳障害について明らかにすることと、これまでに得られた研究成果から新規検査キット・治療薬の開拓を共同研究する国際企業の選定と、学術的な国際研究協力施設の設定である。</p>		
研究経過の概要	<p>新たな研究成果として、眼科手術時に使用される医療材料であるシリコンオイルが充填された眼球中でも網膜フェルトーシスが確認され、この病態が眼トキソプラズマ症における網膜障害と類似である研究報告を行った(研究成果2を参照)。</p> <p>またPCT出願された関連特許に対してJSTの追加支援が、アメリカ・ブラジルでの出願に対して決定され、現在当該国への特許出願を進めている。</p>		
研究成果の概要	<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 は出願完了していたが、今回、JSTの支援を獲得しPCT出願が完了。 JSTの追加支援が決定し、現在アメリカ・ブラジルでの特許出願へ準備中</p>		

<p>研究成果の 発 表</p>	<p>(1) “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.</p> <p>(2) “Silicone oil, an intraocular surgical adjuvant, induces retinal ferroptosis.” Ushio-Watanabe N(7 番目), Nishikawa Y(11 番目), Kaneko H(18 番目). (合計 18 名) Free Radic Biol Med. 2025 Feb 16;228:33-43.</p>
----------------------	---

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月13日

採択番号	2024 共同-2		
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	ウシバベシア原虫細胞内超微細構造を解明するための 反復拡大顕微鏡法(iU-ExM)の確立		
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	酪農学園大学獣医学群医動物学ユニット・講師	
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	2024年4月1日 ~ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>近年、分子間の距離を4倍にすることができる拡大顕微鏡法(U-ExM)の確立により、広視野顕微鏡や共焦点顕微鏡で70nmオーダーの解像度を得ることができるようになった。獣医学領域でその制圧が課題となっているウシバベシア原虫は1-2.5μmのサイズであり、原虫先端部において侵入関連分子分泌制御を司るコノイド構造や、感染赤血球内部を再構造化することで原虫由来タンパク質を赤血球表面へと輸送する分子が存在すると考えられている。しかしながら、従来の共焦点顕微鏡の解像度では細胞内超微細構造構成分子の詳細な解析に限界があった。この問題を克服するために申請者は本共同研究で<u>ウシバベシア原虫における反復膨張顕微鏡法(iU-ExM)の確立を目的</u>とする。本手法は従来のU-ExM法における膨張と標識の過程を繰り返す手法であり、13-21倍のサンプル拡大により電子顕微鏡と遜色のない解像度を示すことが期待できる。確立した手法を用いて原虫先端部のオルガネラ構造、原虫間におけるER-Goldiネットワーク、原虫のタンパク質輸送機序といった従来のイメージング技術で微細解析が困難であった分子機序の解明に挑戦する。</p>		
研究経過の概要	<p>2024年度は本共同研究で使用するウシバベシア原虫受入のための環境整備(BSL2/P2区分培養環境整備)と原虫の移管手続きを実施した。現在は移管した原虫の培養順化を行っており、順化後に原虫感染赤血球を用いた実験に取り組む予定である。また現在まで原虫感染赤血球を使用できない期間においては所属先附属農場より採血した非感染ウシ赤血球を用いたiU-ExM法の予備実験を実施している。また2024年9月と2025年2月には麻田博士との研究打ち合わせを行い、本研究で使用する原虫細胞小器官並びに輸送タンパク質に特異的な抗体作製の相談を実施した。</p>		

研究成果の 発 表	2024 年度は非感染赤血球を用いた iU-ExM 法の最適化実験のみを実施したため関連学会や国際誌での発表は行なっていない。2025 年度も本課題を継続するため、2025 年度の獣医学会あるいは寄生虫学会での口頭発表を予定している。
--------------	---

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2025.5.14

Project no: 2024-joint-3

1. Principal investigator

Name: Liqing Ma

Position: Professor

Affiliation: Qinghai Academy of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Qinghai University, China

2. Project title:

Uncovering tick vectors that transmit zoonotic *Babesia* species in China

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Naoaki Yokoyama

Position: Professor

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

April 1, 2024- March 31, 2025: one year

5. Purposes and objectives

Human babesiosis is an emerging tick-borne zoonosis caused by protozoan parasites of the genus *Babesia*. Human babesiosis is a hemolytic disease, presenting symptoms that range from mild flu-like illness to severe anemia. The disease can be fatal, particularly in elderly and immunocompromised patients. Globally, most human cases are caused by the following seven zoonotic *Babesia* species: *Babesia microti*, *B. duncani*, *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. odocoilei*, *Babesia* sp. KO1, and *B. crassa*-like species. In China, several human cases have already been documented, highlighting the need for effective surveillance and control strategies.

The strategies for controlling human babesiosis should consider the endemic zoonotic *Babesia* species and their specific tick vectors. Despite this, the endemic tick vectors transmitting zoonotic *Babesia* species in China remains limited, presenting challenges for surveillance, risk assessment, and public health response strategies.

The main aim of this study is to identify potential tick vectors of zoonotic *Babesia* species in China, with a particular focus on the Qinghai-Tibetan Plateau region, a hotspot of tick activities and a zone where livestock–wildlife–human interactions are common.

To achieve this goal, the specific objectives of our research are:

- To collect questing ticks from various ecological zones in Qinghai province.

- To screen collected ticks for zoonotic *Babesia* species using PCR assays.
- To map the distribution of zoonotic *Babesia* species and their vectors, thereby supporting the development of effective control strategies for human babesiosis.

6. Outline of research process

From FY2024 to early FY2025, we conducted extensive field surveys across multiple regions in Qinghai Province, including Minhe, Huzhu, Huangyuan, Menyuan, Xunhua, and Guide, with a particular focus on grassland habitats and forest edge environments. Questing ticks were collected using a flagging method. Ticks were morphologically identified to the species level, using established taxonomic keys, and their DNAs were extracted. The tick DNAs are currently being screened in the PCR assays developed by Prof. Yokoyama's lab at NRCPD, targeting seven major zoonotic *Babesia* species. Positive samples will undergo sequencing and phylogenetic analyses to identify the specific zoonotic *Babesia* species. The resulting data will be used to create an epidemiological map, illustrating the geographical distribution of zoonotic *Babesia* species and their potential vectors.

7. Outline of research achievements

- Over 3,000 questing ticks were successfully collected and cataloged across Qinghai province.
- Morphological identification of the collected ticks confirmed the presence of *Haemaphysalis qinghainesis* and *Dermacentor nuttalli*.
- DNAs were extracted from all collected ticks, and PCR screening for zoonotic *Babesia* species is currently in progress.
- Collaboration with NRCPD has been strengthened through training and technical support.
- Our laboratory has gained valuable experience in advanced pathogen detection techniques, enhancing our diagnostic and research capacity.

8. Publication of research achievements

In Progress.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月2日

採択番号	2024 共同-4		
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物質の動物生体内動態解析・安全性評価に向けた 分析方法の検討		
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 (役割分担) 対象化合物の単離・精製・物性検討、グループ統括	
研究分担者	あぼし たかこ 網干 貴子	山形大学・農学研究科・准教授 (役割分担) 生体試料中の LC/MS・GC/MS 分析と方法検討	
	なりた こういち 成田 紘一	東北医科薬科大学・薬学部・講師 (役割分担) 対象化合物の合成による量の確保	
	こんの たいすけ 金野 太亮	東北医科薬科大学・薬学部・助教 (役割分担) 生体試料の LC・GC 注入前処理方法の検討	
	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 (役割分担) 抗トリパノソーマ活性試験、動物実験	
研究期間	2024年4月1日 ~ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>2023 年度原虫病研究センター共同研究「漢方薬構成生薬—特に基金・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」をはじめ、当グループでは抗トリパノソーマ活性物質の探索を主題に継続的に研究活動を行っている。当課題は、そのうちマメ科 <i>Astragalus</i> 属、<i>Oxytropis</i> 属あるいはシソ科 <i>Scutellaria</i> 属、またキク科 <i>Artemisia</i> 属由来のアルカロイドやフラボノイド、テルペノイド類が、有力な抗トリパノソーマ活性を示した成果を起点に展開してきた共同研究課題の新たな方向性探索に位置づけられる。</p> <p>すなわち、1. 天然物医薬シーズ探索により、アルカロイド、フラボノイドに加え、テルペノイドやリグナンで一定のトリパノソーマ生育阻害活性物質を示す化合物を明らかにした。2. それら有力な化合物のうちいくつかについて、化学合成により構造多様性を創出し、構造活性相関を検討した。結果、毒性が少なく活性を維持した分子を見出している。3. 特にオキサゾール類はマウス <i>in vivo</i> 試験まで行われ、特許出願に至っている。4. ここまでの知見を十分に活用し、市販されている漢方薬配合生薬(類縁化合物が得られる)から有力な抗トリパノソーマ活性化合物・画分を得ることを目標に特定の生薬成分を候補として見出した。5. 獣医学領域で漢方薬・生薬の利用が現実的であるかの評価・調査を進めることを、当課題研究分担者を加え進めてきた。</p> <p>上記の通り、獣医学領域と薬学のお互いの強みを活かした共同研究が開始された一方で、天然物としては有力な候補化合物を見出したものの、「これまでに分析方法などの先例が存在しない対象物質について、どのように動物生体での薬物動態解析と安全性評価を行うか」が重要な共通の課題として上がった。</p>		

	<p>そこで、当申請課題では、I. これまで見出した抗トリパノソーマ活性オキサゾールやフラボノイドが実際に動物体内で吸収・効果発現・蓄積するかなど動態に関する知見を得ること。II. 揮発性があり、一般的な濃縮操作や UV 検出が困難なテルペノイド類の簡易的分析方法に関する知見を得ること。を目的に研究を行う。</p>
<p>研究経過の概要</p>	<p>今年度の研究を進めるにあたり、サンプルの準備から動物実験計画、液体・ガスクロマトグラフィー (LC・GC) 分析用前処理方法や分析条件について web 会議、対面ミーティング等で確認・検討した。次に各担当者の専門に応じて次の手順で各種実験を行った。</p> <p>① 東北医薬大で対象化合物(オキサゾールアルカロイド: 2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole、アシル化リグナン: brachangobinan A)の合成が成された。</p> <p>② フラボノイドの 1 化合物を加えて、上記と併せて 3 種類の化合物について試験用サンプルを調整した。またテルペノイド含有エキスを調整した。</p> <p>③ 上記で調整した試験用サンプルのオキサゾール (2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole)、アシル化リグナン (brachangobinan A)、フラボノイド(化合物 X1 とする)、テルペノイド(特定の精油混合物)について、マウスに腹腔内投与、経口投与、経皮投与それぞれで与え、経時的に採血しサンプルを得た。 (「動物実験等に関する規程」に従い、帯畜大「動物実験委員会」の承認済)</p> <p>④ 血液サンプル中の対象化合物と代謝化合物をターゲットに HPLC 並びに GC/MS を用いた分析を行った。すなわち東北医薬大で簡易分析を志向し、HPLC/PDA・UV・IR で分析方法を検討した。また、山形大で高感度分析を志向し、GC/MS で検出条件や分析方法を検討した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p><実験用化合物の合成> 今回の一連の実験に供するためのオキサゾールアルカロイド 1 種類、アシル化リグナン 1 種類を化学合成により確保しており、投与用に調整した。</p> <p><投与・採血・試料化> マウスに各化合物群【オキサゾール (2-(2',3'-dihydroxyphenyl)-5-(2''-hydroxyphenyl) oxazole)、アシル化リグナン (brachangobinan A)、フラボノイド(化合物 X1)、テルペノイド(特定の精油混合物)】別に腹腔内・経口・経皮で投与し、投与前・30 分・60 分・4 時間・1 日・2 日・4 日後に Dry Blood Spot (DBS) 法により採血。試料保存した。</p> <p><HPLC 分析・GC/MS 分析> ・オキサゾールアルカロイド: HPLC/PDA・UV・IR で分析を行った。 ・アシル化リグナン: HPLC/PDA・UV・IR で分析を行った。 ・フラボノイド: HPLC/PDA・UV・IR で分析を行った。 上記 3 群について、腹腔内・経口・経皮いずれもマウス血中成分と考えられる全てに共通する成分ピークと、群と時間に固有のピークが複数認められた。 ・テルペノイド: GC/MS により分析を行った。 経皮投与→いずれの試料もピーク検出されず。 経口投与→30 分サンプルでテルペノイドと考えられる成分ピーク A が比較的強く検出され、60 分・4 時間でもわずかに検出された。他の時間帯サンプルはピークが検出されなかった。 腹腔内投与→投与前サンプルと 3 日サンプルからピーク B が検出された。</p>

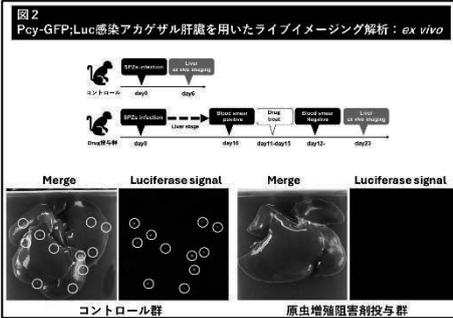
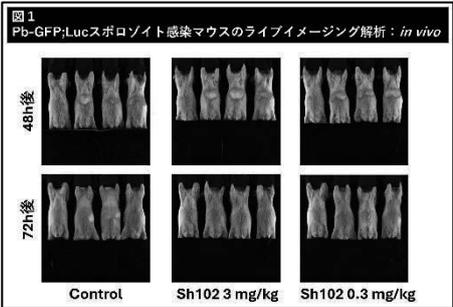
	<p><今後の展開></p> <p>HPLC 分析、GC 分析における各種ピークの化合物同定と、より効果的な分析方法の確立が今後の課題である。</p>
研究成果の 発 表	論文 1 報を投稿中である。

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月30日

採択番号	2024 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	河津 信一郎
研究課題名	マラリア原虫に対するヒストン化学修飾化合物の薬剤評価系の確立		
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	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 安全管理研究センター/寄生動物・主任研究員	
研究分担者	あんのうら たけし 案浦 健	国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 寄生動物・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	2024年4月1日 ～ 2025年3月31日		
目的・趣旨	マラリア原虫の増殖は、ハマダラカ体内、ヒト肝臓細胞内(肝内型)、赤血球内(赤内型)の3ステージに分かれ、各段階で異なる増殖制御機構が働くと考えられるが、その分子基盤は未解明な点が多い。申請者らはヒストンの制御機構に着目し、マラリア原虫特有のエピジェネティック制御の特徴を解析してきた。既存の報告では、ヒストン修飾酵素阻害剤によって各ステージで異なる応答が見られるが、その詳細は不明である。昨年度、申請者は独自の阻害化合物ライブラリーを用いて赤内型と肝内型への <i>in vitro</i> 増殖阻害試験を行い、有効な化合物を得た。本申請では、それらを用いた <i>in vivo</i> ライブイメージング解析により、ヒストン修飾を介した原虫増殖制御の解明を目指す。		
研究経過の概要	本申請研究では、申請者らが <i>in vitro</i> 試験により選定したヒストン修飾酵素阻害化合物を用いて、マラリア原虫の肝内型および赤内型に対する増殖阻害効果を <i>in vivo</i> および <i>ex vivo</i> で検証し、ライフサイクル各段階におけるヒストン制御機構と原虫の増殖との関連を明らかにすることを目的とする。具体的には、Luciferase(以下 Luc)発現ネズミマラリア原虫(Pb-GFP;Luc)を用い、マウスへの感染モデルにおいて薬剤投与後の臓器内 Luc シグナルをライブイメージング機器(NEWTON7.0)で測定し、赤内型および肝内型における阻害効果を評価する。また、効果の認められた化合物については、Luc 発現サルマラリア原虫(Pcy-GFP;Luc)を用いたアカゲザル肝臓での <i>ex vivo</i> 評価を実施する。これらの結果をもとに、ヒストン修飾による原虫のステージ特異的な増殖制御メカニズムの解明を目指す。		

<p>研究成果の概要</p>	<p>①Pb-GFP;Luc を用いた NEWTON7.0 によるライブイメージング解析</p> <p>Pb-GFP;Luc スポロゾイトをマウスに感染させ、感染前日と当日にヒストン修飾酵素阻害剤 sh102 を経口投与し、肝内型原虫に対する効果を検証した。sh102 は、<i>in vitro</i> 肝内型にのみ増殖阻害効果を示し、宿主細胞への毒性が低い化合物である。感染後 48 時間のマウス肝では、Luc シグナルにコントロールとの差は見られず、投与濃度 (3 mg/kg、0.3 mg/kg) にも依存しなかった。しかし、72 時間後、肝内型から赤血球内型への移行時には、Luc シグナルがコントロールと比べて顕著に低下した。このことから、sh102 は肝内型原虫の後期において効果を示す可能性があるが、詳細な作用時期や機序の解析が必要である。赤血球内型で効果を示した他の化合物は細胞毒性が高く、<i>in vivo</i> 評価には不向きであったため、本研究ではまず肝内型を対象とした。今後は、さらに多くの化合物の評価を進め、赤内型でも同様の検討を行い、ヒストン制御因子のマルチステージにおける解析を目指す。</p> <p>②Pcy-GFP;Luc 感染アカゲザル肝臓を用いたライブイメージング解析</p> <p>ヒストン修飾酵素阻害剤の評価に先立ち、既存の抗マalaria薬によるアカゲザル感染モデルでの検証を行った。Pcy-GFP;Luc スポロゾイト感染 6 日後、肝臓で Luc シグナルが確認された。一方、抗マalaria薬を投与した群では、肝臓・血中ともにシグナルは検出されなかった。この結果から、NEWTON 7.0 を用いた薬剤評価系は、サルマalariaでも有効であり、ヒストン修飾酵素阻害剤の評価にも適用可能と考えられる。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>1 <u>荒木球沙</u>, 小山哲秀, 吉村比呂, 荒井絢子, 川合覚, 関澤秀斗, 梅木優子, 中野由美子, 今井孝, 岡本宗裕, サトウ恵, Wipaporn Thabthimthong, Taratorn Kemthong, 久枝一, Suchinda Malaiwijitnond, 案浦健「Droplet Digital PCR を用いたサルマalaria流行地におけるハマダラカの疫学調査」第 94 回 日本寄生虫学会大会, 2025 年 3 月 吹田市.</p> <p>2 <u>荒木球沙</u>, 角田宗一郎, 川合覚, 小林宏尚, 関澤秀斗, 中野由美子, 久枝一, 案浦健, 「マalaria原虫のユニークな増殖機構とオルガネラ制御メカニズムの解明」第 47 回 日本分子生物学会, 2024 年 12 月 福岡市.</p> <p>3 <u>荒木球沙</u>, 角田宗一郎, 川合覚, 小林宏尚, 梅木優子, 立石祐樹, 関澤秀斗, 中野由美子, 岡本宗裕, 保富康宏, 久枝一, 案浦健. 「マalaria原虫における増殖メカニズムの解明」第 57 回日本原生生物学会大会, 2024 年 11 月 山口市.</p> <p>4 <u>荒木球沙</u>, 川合覚, 小林宏尚, 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原虫における <i>ex vivo</i> ライブイメージングシステムを用いた肝内型発育期の解析」日本共生物学会 第 8 回大会, 2024 年 10 月 筑波大学 つくば市.</p> <p>5 <u>荒木球沙</u>, 小山哲秀, 吉村比呂, 荒井絢子, 川合覚, 関澤秀斗, 梅木優子, 中野由美子, 今井孝, 岡本宗裕, サトウ恵, Wipaporn Thabthimthong, Taratorn Kemthong, 久枝一, Suchinda Malaiwijitnond, 案浦健. 「droplet digital PCR</p>



	を用いた高度サルマラリア流行地域における Anopheles からのマalaria DNA 検出」 第 83 回日本寄生虫学会東日本支部大会/第 75 回日本衛生動物学会東日本支部 大会合同大会, 2024 年 10 月 東京大学 文京区.
--	--

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2025.4.28

Project no: 2024-joint-6

1. Principal investigator

Name: Apinya Arnuphapprasert

Position: Lecturer

Affiliation: Rajamangala University of Technology Srivijaya

2. Project title:

Isolation of *Babesia bovis* of Thai origin and characterization of the VESA gene family encoding its virulent factors

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: ASADA Masahito

Position: Associate Professor

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

April 1, 2024 – March 31, 2025

5. Purposes and objectives

This study aims to establish cryostabilates of *Babesia* parasites and genetically characterize genes related to virulent factors, specifically the VESA gene family, from Asian isolates of *Babesia bovis*, providing valuable insights into parasite biology. The parasite cryostabilates acquired in this study will be valuable for future research, including genome-wide studies, as well as the development of drugs.

6. Outline of research process

Research in Thailand

1. Blood sample collection:

Blood samples were collected from 15 cattle that exhibited *Babesia*-like clinical signs, including depression, loss of appetite, anemia, dark-colored urine, and a history of contact with ticks, the vector of *Babesia bovis*. The blood was added cryopreserve reagent and stored in liquid nitrogen.

2. Blood smear screening:

Blood samples were smeared onto slides, fixed with methanol, and stained with 10% Giemsa solution. The slides were then examined under a light microscope (1000x magnification) to identify the piriform

shape, which is characteristic of Babesia.

3. DNA extraction:

DNA was extracted from 200 µL of each blood sample using a commercial kit (NucleoSpin Blood Extraction Kit).

4. PCR screening:

Fifteen samples were screened by PCR using the primers BTH 18S 1st F (GTGAAACTGCGAATGGCTCATTAC) and BTH 18S 1st R (AAGTGATAAGGTTACAAAATTCC) for the first round of PCR. The second round of PCR used primers BTH 18S 2nd F (GGCTCATTACAACAGTTATAGTTTATTTG) and BTH 18S 2nd R (CGGTCCGAATAATTCACCGGAT), following the protocol described by Masatani et al. (2017).

Only PCR-positive samples had their first-round PCR products prepared and sent to the National Research Centre for Protozoan Diseases (NRCPD) at Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Japan, for further analysis.

Research at NRCPD

1. DNA Sequencing:

PCR products were re-amplified using the second-round primers and a larger reaction volume (50 µL). The predicted PCR bands were excised and purified using a gel purification kit (NucleoSpin PCR Clean-up and Gel Purification Kit). The purified products were then subjected to sequencing.

2. Nucleotide Analysis:

The obtained sequences were edited using BioEdit software and compared against known sequences using the nBLAST tool.

7. Outline of research achievements

Out of 15 samples, 6 samples were positive from PCR (about 1,500 bp). The result from sequencing revealed that three samples were *B. bovis*, two samples were *B. bigemina* and one sample was *T. orientalis*. There were two tubes of *B. bovis* of Thai strain were stored in liquid nitrogen.

8. Publication of research achievements

Reference

Masatani, Tatsunori, et al. "Detection and molecular characterization of Babesia, Theileria, and Hepatozoon species in hard ticks collected from Kagoshima, the southern region in Japan." *Ticks and tick-borne diseases* 8.4 (2017): 581-587.

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2025.5.30

Project no: 2024-joint-7

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: Dr. Masahito Asada

Position: Associate Professor

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

01/04/2024 -31/03/2025, one year

5. Purposes and objectives

The 2024 NRCPD-OUAVM Joint Research Proposal sought to expand on our prior collaborative efforts (2019, 2022, 2023, 2024), where we successfully developed transgenic *Babesia bovis* and *Babesia divergens* parasites expressing DiCre recombinase. This technology facilitates the functional analysis of essential parasite genes, previously demonstrated in model species such as *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. The 2024 proposal aimed to leverage the stable DiCre parasite lineages of *B. bovis* and to perform conditional -inducible- knockouts (cKO or iKO) of aspartyl proteases BdASP3a (023140) and BdASP3b (006490) of the C clade of apicomplexan aspartyl proteases, which are analogous to plasmepsins X/IX for *P. 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 *Babesiosis* control.

6. Outline of research process

In accordance with the proposed plan, we utilized the extended project timeline to generate cloned populations of DiCre-expressing *B. bovis* and *B. divergens*. During the course of this work - including Dr. Dede's research visit to NRCPD-OUAVM from February 21 to March 18, 2025 - we successfully confirmed DiCre integration in *B. bovis*. Following the visiting, we also verified the presence of DiCre in *B. divergens*.

Both species were targeted using the same gene of interest (GOI) for homologous recombination; however, in *B. divergens*, the selected GOI unexpectedly impaired parasite growth and disrupted the blood cycle stages. As a result, despite obtaining a DiCre-integrated clone, we must now select an alternative GOI and generate new DiCre lines.

In parallel, we prepared control GFP/mCherry plasmid vectors for episomal monitoring of LoxP site excision by DiCre recombinase in *B. bovis*. Transfection of these plasmids into *B. bovis* is currently underway to validate Cre/LoxP excision efficiency.

The 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 *B. 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 *B. bovis* and the Cre/Lox excisions are currently being confirmed by transfection of these plasmids to *B. bovis* DiCre lineages. We are currently in the process of designing a *B. divergens* expression plasmid based on the established *B. bovis* vector system, with necessary adaptations to ensure compatibility with *B. divergens* biology and expression requirements.

The study also targeted *B. bovis*, a key pathogen inducing bovine babesiosis in NRCPD-OUAVM. Dr. Asada's group transfected *B. bovis* with two plasmids: one has the DiCre recombinase and the other has LoxP (GFP-mCherry) sites respectively. In Dr. Alper Dede's stay, successful integration of these genetic elements was partially monitored and validated using the Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) and specific Polymerase Chain Reaction (PCR) assays. The precise placement of LoxP sites were confirmed. Additionally, the regions with targeted primers were proved and, will be prepared for rapamycin-induced excision verification (still ongoing to detect the correct drug concentration). Dr. Dede collaborated on the design and preparation of LoxP holding plasmid cassettes and the preparation of transgenic *B. bovis*. It was also decided that plasmids would be constructed following the design: 5'HR-LoxP-Gene of Interest (GOI)-Myc-Terminator-BgActin-BSD-LoxP-3'HR. He contributed to phenotypic analysis and transgenic *Babesia* isolation. He participated in discussions on the knock-in and knock-out technologies that target specific genes, for instance, those in heme and proteolytic pathways, to identify their essential roles in *Babesia* spp. These efforts advanced understanding a clearer insight into transgenic parasite preparation and supported the objectives for the experimental goals of the Sojka lab.

Furthermore, the live imaging of the parasites that contain mCherry gene enabled us to observe gene expression in real time and successful transfection. A substantial improvement towards conditional gene manipulation in *B. bovis*, these cultures were maintained under drug selection or induction conditions to maintain the DiCre-LoxP system activity.

In addition, we successfully continued the characterization of the two BdASP3 isoenzymes, which were recombinantly expressed in *E. coli* DE3 as C-terminal 6x(His)-tagged proteins in an insoluble form. This approach, which replaced the initially planned expression in baculovirus-infected insect cells due to issues with low yields and protein instability, has proven effective. The *E. coli*-expressed BdASP3 proteins were purified under denaturing conditions and subsequently refolded via step-down dialysis from 8 M urea buffers. The refolded proteins were confirmed to be catalytically active and are currently used in kinetic assays with fluorescent peptidyl substrates. In addition, we have successfully generated inactive mutant variants of both BdASP3 isoenzymes by substituting a key aspartic acid residue with alanine. These mutants are currently being used in large-scale production aimed at obtaining high-quality crystals for structure determination via X-ray crystallography. All the results obtained during 2023–2024 will be included in a forthcoming publication planned for submission to a high-impact journal by the end of 2025, with Pavla Šnebergerová as the first author and Dr. Sojka as the last and corresponding author.

Our findings were presented at several international conferences in 2024 and 2025. Dr. Sojka made two active contributions at the 15th International Symposium on Ticks and Tick-borne pathogens TTP 11th in Cuba, presenting on 'Proteases associated with the apical complex of Babesia' and International Babesiosis Meeting 2025 presenting "Proteases driving the apical complex of Babesia during egress and invasion of host red blood cells.

7. Outline of research achievements

- Successfully obtained cloned populations of DiCre *B. bovis* and *B. divergens*, but *B. divergens* need a different design.
- We PCR confirmed their integration to the parasite genome
- Lox-flanked GFP/mCherry holding plasmid vectors for episomal control of LoxP site excision by the DiCre recombinase in *B. bovis*
- We designed the final plasmid for BdASP3 cKO using the DiCre approach.
- Live imaging of *B. bovis* with mCherry was achieved.
- 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

Some of the experience gained during this project contributed to the study published by Robbertse et al. (2024), titled “Evaluating Antimalarial Proteasome Inhibitors for Efficacy in Babesia Blood Stage Cultures” in ACS Omega (PMCID: PMC11561622, PMID: 39554424).

9. Future goals

Our future goals include obtaining *B. divergens* DiCre and LoxP clones carrying mCherry and BSD resistance markers, followed by confirmation of successful transfection using IFAT, PCR integration, and flow cytometry. The final plasmid for the conditional knockout (cKO) of BdASP3, containing a floxed BdASP3 gene sequence, has been designed and will be transfected upon completion of Cre/Lox episomal excision validation. The resulting cKO BdASP3a/b lines will enable rapamycin-induced gene excision and phenotypic analysis. This approach will also be used to monitor the effects of other genes of interest (GOIs) on parasite development. Importantly, this cKO system represents a valuable tool for the *Babesia* research community, enabling functional studies of essential genes—many of which encode high-priority enzymatic targets for future therapeutic development.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月28日

採択番号	2024 共同-8		
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	新規ゲノム編集 CRISPR/Cas3 系によるトキソプラズマの ゲノム"ごそつ"欠損方法の開発		
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 国際協力教育部門・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	2024年4月1日 ～ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>CRISPR/Cas3 を用いたゲノム編集技術は、①標的配列を決定するガイド RNA が長く、特異性を確保しやすいこと、②gRNA 配列の 5'側において最大約 100 kb にわたる広範なゲノム領域を欠損させることが可能である、という特徴を有する。本技術は、2019 年に哺乳類細胞においてその再構築およびゲノム編集への応用が報告された新しいタイプのゲノム編集技術であり、これまでに原虫への導入例は報告されていない。</p> <p>本研究の目的は、この新規ゲノム編集技術である CRISPR/Cas3 をトキソプラズマに導入し、原虫において本技術が導入された際に、どのような割合・長さのゲノム欠損が生じるのかという基礎的知見を蓄積することである。これらの知見は、将来的に病原性因子を広範に欠損させた「最弱トキソプラズマ」の創出に向けて、大規模なゲノム欠失を誘導するための基盤技術の確立に貢献すると期待される。</p>		
研究経過の概要	<p>(1)CRISPR/Cas3 システム発現原虫の作出</p> <p>ヒト細胞で再構成された CRISPR/Cas3 システム (PMID: 31811138) をトキソプラズマに導入するため、トキソプラズマ特異的な遺伝子発現制御配列に置換したプラスミドを新たに構築した。また、モデル遺伝子として選定した <i>uprt</i> 遺伝子領域を標的とするガイド RNA についても、設計を完了した。</p> <p>(2)モデル遺伝子座を利用した、CRISPR/Cas3 が引き起こすゲノム欠損の評価</p> <p>導入された CRISPR/Cas3 コンプレックスが原虫内でどのようなゲノム欠損を誘導できるかを評価するため、ネガティブセレクションが可能なモデル遺伝子座として <i>uprt</i> 遺伝子座を用いた。原虫病研究センターから分与を受けた RH 株において、Cas3 複合体および対応する guide RNA を発現させ、標的位置におけるゲノム欠損を解析した。その結果、他生物での報告と同様に、gRNA 標的部位の近傍から上流方向に数百～数千 bp</p>		

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年6月12日

採択番号	2024-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	ハダニの卵黄形成における光周性の分子機構		
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	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	
	りすまやに Rismayani	東京農工大学大学院生物システム応用科学府・大学院生	
	おおさこ ともひろ 大迫 朋寛	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	2024年4月1日 ～ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>殺虫剤抵抗性が発達しやすい難防除害虫であるナミハダニ(以下、ハダニ)は、温帯および冷帯地域では秋から春にかけて休眠状態で越冬する。ハダニは産雄性単為生殖であり、その休眠は、雌のみ成虫の段階で誘導される。ハダニの休眠の誘導因子は長夜であり、節足動物の光周性のモデルシステムとして、半世紀以上研究が進められてきた。休眠が誘導された雌成虫では、体色が黄緑色からオレンジ色に変化し、生殖は停止する。近年のゲノム解析により、体色変化に関与するカロテノイド合成遺伝子や卵黄タンパク質前駆体のビテロジェニン(Vg)やその受容体(VgR)が同定されている。しかし、体色変化と卵黄形成の関係や、それぞれの上流にある共通のトリガー因子は不明である。他方、同じダニ目に属するマダニでは、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mTOR経路によってVg合成が制御されることが判明している。そこで本研究では、マダニの卵黄形成の専門家である白藤博士との共同研究の実施により、ハダニのmTOR経路を解析し、光周期依存的なVg合成および体色変化と両者の関係における分子機構の解明を目指す。</p>		
研究経過の概要	<p>ナミハダニの光周性機構の分子基盤の解明を目的とし、休眠(D)個体群と非休眠(ND)個体群を用いた以下の実験を実施した。まず、戻し交配実験を実施し、非休眠形質の遺伝様式を解析した。次にbulked segregant解析(BSA)を実施し、責任遺伝子座の染色体上での位置の特定を試みた。また、両個体群を休眠/非休眠誘導条件下で飼育し、トランスクリプトームおよびプロテオーム解析により遺伝子発現パターンをRNAおよびタンパク質レベルで調査した。最後に、特定した候補遺伝子に対してRNA干渉(RNAi)法による機能解析を実施した。他方、D個体群における体色変化の原因遺伝子の探索を目的とし、休眠誘導条件下での経時的なプロテオーム解析も実施した。</p>		

<p>研究成果の 概 要</p>	<p>本研究により、ナミハダニの非休眠形質は単一の遺伝子座による顕性遺伝であることが明らかになり、母性遺伝は関与しないことが確認された。BSA 解析により、責任遺伝子座 (ND 遺伝子座) の候補は、第 1 染色体の 2 つの近接領域に存在し、連鎖していることが判明した。この領域には計 16 個の遺伝子が座乗していた。トランスクリプトーム解析では、16 遺伝子のうち 12 遺伝子で RNA が検出された。さらに、遺伝子間領域において、D および ND 個体群で鎖長が異なり、かつ 9 個の SNPs を含む long non-coding RNA (lncRNA) を発見した。プロテオーム解析では、主成分分析により個体群間の発現パターンの差異が明確に示され、12 遺伝子のうちの 1 遺伝子については、D および ND 個体群で発現量が異なることが判明した。RNAi 実験では、lncRNA 抑制区において他の処理区と比較して非休眠率の有意な上昇が認められ、この lncRNA が休眠制御に重要な役割を果たすことが示唆された。他方、体色変化の分子機構の解析では、すでに報告されていたカロテノイド生合成酵素群に加え、脂質代謝関連の酵素も関与している可能性が示された。</p>
<p>研究成果の 発 表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Rismayani, K. Sai, T. Ohsako, Y. Arai, N. Takeda and T. Suzuki (2024) Proteomic evidence for carotenoid biosynthesis upregulated upon induction of diapause in the two-spotted spider mite, <i>Tetranychus urticae</i> Koch. 第 33 回日本ダニ学会大会, 静岡, 2024 年 9 月 18–19 日 (口頭) 2) 大迫朋寛, 武田直樹, 鈴木丈詞 (2024) ナミハダニの休眠を誘導する光周性の分子機構. 第 33 回日本ダニ学会大会, 静岡, 2024 年 9 月 18–19 日 (口頭) 3) Rismayani, K. Sai, T. Ohsako, Y. Arai, N. Takeda and T. Suzuki (2025) Carotenoid biosynthesis and lipid metabolism during photoperiodic induction of diapause in the two-spotted spider mite, <i>Tetranychus urticae</i> Koch. 第 69 回日本応用動物昆虫学会大会, 幕張, 2025 年 3 月 20–22 日 (口頭) 4) 大迫朋寛, 武田直樹, 鈴木丈詞 (2025) マルチオミックス解析によるナミハダニの光周性関連遺伝子のスクリーニング. 第 69 回日本応用動物昆虫学会大会, 幕張, 2025 年 3 月 20–22 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

2025年5月28日

採択番号	2024 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	ヒメダニ科 <i>Ornithodoros moubata</i> の人工吸血法による 回帰熱ボレリア <i>Borrelia duttonii</i> 感染実験系の樹立		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	さとう こずえ 佐藤 梢	国立感染症研究所 細菌第一部・研究員	
研究分担者	かわばた ひろき 川端 寛樹	国立感染症研究所 細菌第一部・室長	
	きゅう えいしん 邱 永晋	北海道大学大学院獣医学研究院・客員研究員	
	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	2024年4月1日 ~ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>ダニ媒介性感染症の病原体はダニの唾液腺に侵入・定着し、吸血行動中に唾液腺から分泌される唾液とともに哺乳類等の宿主に吐出される。ダニの唾液には宿主免疫を調節する生理活性物質が含まれるが、近年、ダニ媒介性の病原体の一部は、これらのダニ唾液成分の一部と結合することで宿主の免疫機構を回避し、感染を成立させることが明らかとなってきた。他方、ヒメダニの一種であるオルニソドロス属ダニが媒介する回帰熱群ボレリアについても、同様のメカニズムが存在する可能性があるが、これに関する研究は未だ報告がない上に、それらを調べる手法の開発も遅れている。そこで本研究では、オルニソドロス属ダニによる回帰熱群ボレリア伝播メカニズムの全容を明らかにすることを目的とし、その研究に着手するための研究基盤の樹立を行う。</p>		
研究経過の概要	<p>マダニ科の唾液因子の研究から <i>O. moubata</i> の唾液成分は <i>B. duttonii</i> の伝播促進に関与している可能性があるが、その証明はなされていない。なぜなら、<i>B. duttonii</i> 感染 <i>O. moubata</i> の作出など、唾液因子が <i>B. duttonii</i> に与える伝播促進を調べる手法の開発が遅れているためである。そこで本研究では、帯広畜産大学で飼育管理している <i>O. moubata</i> を活用し、『<i>B. duttonii</i> 感染 <i>O. moubata</i> の作出』を行った。<i>B. duttonii</i> 感染 <i>O. moubata</i> を作出するためには、[1] <i>O. moubata</i> が吸血時に <i>B. duttonii</i> を獲得し、経発育期感染を確認すること、加えて、[2] 経発育期感染した <i>O. moubata</i> が、次の刺咬・吸血するタイミングで <i>B. duttonii</i> を宿主に吐出、かつ感染を確認する必要が考えられた。そのために、以下の方法で研究を実施した。</p>		

【方法と結果】

(1) 人工吸血法の基盤構築

*B. duttonii*は動物由来の血液より、運動性や増殖に影響を受けやすいため、人工吸血法の血液は、実験用血液として購入可能な動物血液2種(ウサギ, ウシ)を実験に供し、脱繊維血ならびに血清の選択を実施した。2種の脱繊維血と血清を3:7の比率で混合した血液(以下、人工血と略)に、試験管培養し、菌数を調整した*B. duttonii*を添加後、34°Cで1晩培養した。暗視野顕微鏡による観察の結果、*B. duttonii*は2種の人工血中で運動性が見られ増殖した。次に、人工吸血装置に人工血を各々加え、*O. moubata*に吸血させた。*O. moubata*は動物種に関わらず、吸血を始め、飽血後、3-4週間で脱皮し、次の発育期に移行した(Fig. 1)。

以上の結果から、2種の人工血は*B. duttonii*, *O. moubata*両方に適していた。一方、*B. duttonii*培養にウ

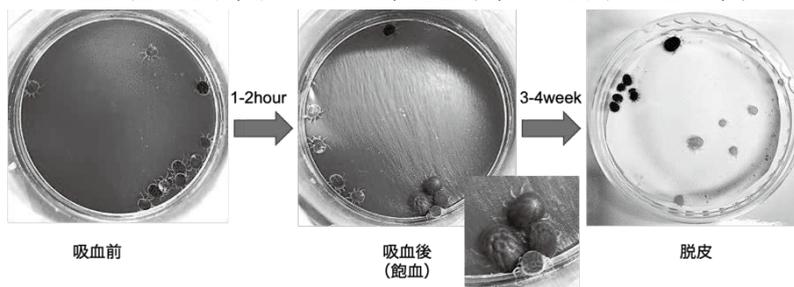


Fig.1 人工吸血装置による*O. moubata*の吸血

サギ血清を含んだ培地が利用されていることから、以下の実験から、ウサギ人工血を使用した。

(2) *O. moubata*が吸血時に*B. duttonii*を獲得し、経発育期感染を成立させるために、人工吸血法で*O. moubata*に*B. duttonii*を獲得させる吸入試験を実施した。

B. duttonii(1×10^7 cell/ml)が添加された人工血を*O. moubata*第2若ダニに吸血させ、経発育した*O. moubata*第3若ダニ(11個体)のDNAを抽出した。TaqMan MGB probeを用いたReal time-PCR法で、各DNAサンプルにおける*B. duttonii* 16S rRNA遺伝子を検出した結果、*O. moubata*第3若ダニの全てから見出された。増幅されたDNA copy数はおよそ 10^2 - 10^3 copies/個体(最大約 10^6 copies/個体)と算出され、*B. duttonii*が*O. moubata*第3若ダニに定着していることが示唆された(Fig. 2)。



Fig. 2 *B. duttonii* 16S rRNA gene in *O. moubata* by Real-time PCR

以上の結果から、吸血時に全ての*O. moubata*が*B. duttonii*を獲得し、経発育期感染することが実証された。

(3) 経発育期感染した*O. moubata*が、次の発育期に移行するために刺咬・吸血するタイミングで*B. duttonii*を宿主に吐出、かつ感染を成立させるために、マウスへの*B. duttonii*感染試験を実施した。

*O. moubata*第2若ダニに*B. duttonii*を獲得させ、経発育した第3若ダニをC3H/HeNマウスの背部で刺咬・吸血させた。吸血後1日目、3日目にマウス尾静脈から採血し、吸

	<p>血後 7 日目に脾臓, 肝臓, ならびに血液を採取した. Real time-PCR 法により, 全ての臓器および血液の DNA サンプルから <i>B. duttonii</i> 16S rRNA 遺伝子は検出されなかった. さらに, Western Blot 法により吸血後 7 日目の血液から分離された血清からの <i>B. duttonii</i> 抗体も検出されなかった.</p> <p>以上の結果から, 刺咬・吸血時に <i>O. moubata</i> からマウスへ <i>B. duttonii</i> の吐出, かつ感染は認められなかった.</p> <p>【まとめと考察】</p> <p>人工吸血法によって, <i>O. moubata</i> は吸血時に <i>B. duttonii</i> を獲得し, かつ経発育期感染が成立することが確認された. しかしながら, 吸血後に脱皮させた <i>O. moubata</i> からマウスへ, ボレリアの伝播は見られなかった. 本結果から, ボレリアは <i>O. moubata</i> の唾液腺まで到達できなかった可能性, もしくは, ボレリアは唾液腺まで到達できたが, 何らかの理由により, 唾液中に吐出されなかった可能性が考えられた. 今後の検討課題として, まず, 経発育期感染した <i>O. moubata</i> の体内で <i>B. duttonii</i> が唾液腺へ確実に侵入・生着できたかを確認する予定である. また, 他の回帰熱群ボレリアでは, 第 3 から 5 ないし 6 若ダニ期, および成ダニ期の病原体伝播や発育時に吸血回数を増やすことで唾液腺への侵入効率が高まる可能性もあることから, 実験に適切なダニ発育期の選択, ならびに, 人工吸血の回数や獲得させる病原体数を検討する.</p>
研究成果の発表	なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月28日

採択番号	2024 共同-11		
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	抗アピコンプレキサ剤の分子標的における <i>in vitro</i> 再構成系および創薬基盤の創世		
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 化合物生産菌プ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	2024年4月1日 ~ 2025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、アピコンプレキサ原虫他、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、トキソプラズマおよびマラリアモデルに対して有効な治癒効果を示す MCF を初めとする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、MCF の作用機序解析から原虫の小胞体を含む分泌経路が有効な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>本研究は、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>		
研究経過の概要	<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</p>		

	<p>チド由来の天然化合物である. 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が, 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 (Arieftha NR et al. AAC. 2023).</p> <p>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>抗原虫剤 MCF の抗原虫作用において, われわれのトランスクリプトーム解析から原虫の小胞体含む分泌経路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. しかし, 原虫で Sar1GTPase を活性化するシステムの実体が未だ分かっていないのが現状でもあった. 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>われわれは, 昨年度までに MCF 作用点と考えられる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共焦点顕微鏡によるマーカー分子の間接蛍光抗体法で可視化した原虫以外の生物で既知の Sar1 の活性化に働く Sar1GEF の配列を基にトキソプラズマゲノム DB から探索したところ, Sec7, WD, 膜貫通ドメインを持つ因子を 1 コピー存在することを見出した. その Sar1GEF 様の因子は, トキソプラズマ以外にネオスポラ, クリプトスポリデウムなど一部のアピコンプレクサ門原虫のみに保存されていた. その配列上の特徴として, 内腔側の C 末端に小胞体残留モチーフ KDEL 配列を持ち, 配列全体の中で Cys 残基に富んでおり, 細胞質側可溶性ドメインの膜貫通ドメイン TMD の直前に Cys リピートドメインを持ち, TMD 内にも存在する. さらに, トキソプラズマ Sar1GEF は, Sar1GTPase と同様, MCF の作用標的であることが分かってきた. この Sar1GEF に対する抗体を作製し, 細胞内局在解析を行った. トキソプラズマにおいて, KDEL レセプターの Erd2 が2コピー存在し, 一方とドット状の共局在性を示すことを確認した. これらの結果は, Sar1GEF の KDEL が小胞体およびゴルジ体間の局在またはソーティングに機能的働くことを示唆する結果でもあった.</p> <p>本年度は, その結果を踏まえ原虫の小胞体の pre-budding complex 形成を触媒する Sar1GTPase と Sar1GEF との間の生体内の素反応の再構成系の構築を行った. Sar1GTPase のドメイン構造と機能性を確認するために酵母変異株を用いた相補性試験を行った. その結果, 宿主側の Sar1GEF と異なり, トキソプラズマ由来は, Cys リピートドメインが生理的に重要であることを確認した. さらに, 酵母内では, KDEL シグナルに依存せずに機能性を示すことを確認した. トキソプラズマ Sar1GEF のアミノ酸配列の特徴から大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の調製が困難と判断し, コムギ胚を利用する <i>in vitro</i> 翻訳システムを用いて系の構築を進めた. 一方, Sar1 は双方の系で発現と精製を行った. その結果, タンパク質は発現したものの, 発現量が少なく, 精製に至らなかった. 今後は, 系のスケールアップを実施し, 精製因子を得る予定である. Sar1 と Sar1GEF との複合体形成を確認する為に, AlphaFold3, MCF と複合体との結合を Bolz_on_Colab.を用いて立体構造の計算予測解析を行った. その結果, Sar1GEF は基質となる Sar1GDP と複合体形成することを確認した. 原虫由来の複合体形成は, 既存の Sar1GEF の K ループに依存した Sar1 への結合とは異なる様式であることが明らか</p>

	かとなった。さらに、MCF が宿主由来 SarGEF には存在しない C399 含む Cys リポドメインとその立体的近傍の R242 と 345, C309 に架橋されていた。この結果は、MCF の宿主に毒性を示さずに原虫特異的に活性を示す要因の1つと考えられた。
研究成果の 発表	<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. Ariefta 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. Ariefta 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. 7. Chen Y, Shimoda N, <u>Nihei C</u>, Sawa R, Nishigori M, Nakamura M, Koshiba T, Ushio N, Nishikawa Y. Mitochondrial damage and IL-18 production of monocytes by <i>Neospora caninum</i> infection is mediated by dense granule protein 7 and prohibitins. <i>Frontiers in Immunology.</i> 2024. <i>in revision.</i>

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2025.5.26

Project no: 2024-joint-12

1. Principal investigator

Name: Dr. Ruenruetai Udonsom

Position: Scientist Expert Level

Affiliation: Protozoology Department, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand

2. Project title:

Molecular detection and genotyping of *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* in domestic animals and wildlife in Thailand

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Professor Yoshifumi Nishikawa

Position: Professor

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

April 1, 2024 to March 31, 2025 (1 year).

5. Purposes and objectives

5.1 This study is to determine the presence and genetic diversity of *T. gondii* infection in cats in Thailand

5.2 To determine *Cryptosporidium* spp and *Giardia duodenalis* infection among domestic animals, including pigs, cats, cattle, and wildlife in Thailand.

6. Outline of research process

Domestic animals such as cattle or pig and several wildlife species are parasitized by *Giardia* and *Cryptosporidium*, and have been considered reservoirs of zoonotic disease. Cats, definitive hosts for *T. gondii*. *T. gondii* oocysts from infected cat can infect human and animals through the environment, including in contaminated foods, water or soil. Therefore, this study the animal stool samples were collected from 61 cattle, 67 pigs, and 175 wildlife specimens from Ayutthaya and Kanchanaburi province and 120 cat stool samples from the refuge at Nakorn Nayok province Thailand for *T. gondii*, *Giardia* and *Cryptosporidium* detection. Ayutthaya province is located in central Thailand which it is a semi-

urban community. Villagers living along the river, namely Chao Phraya River, use the water for agriculture, farming, and transportation. The human activities may produce and discharge waste into water resources, including canals. These characteristics of this area may be suitable for zoonotic risk study. Kanchanaburi is the largest of the western provinces of Thailand. Topographically, it is covered with timber and evergreen forests and has the large numbers of wild animals which can be serve as reservoirs for transmission of zoonotic agents to domestic animals and human. The refuge in Nakhon Nayok province, Thailand is one of the large homes for abandoned of stray cats. Although, cats are potential reservoirs of zoonotic infections to humans and little data exists on the environment and *T. gondii* genotypes in Thailand. **Methods**, *Cryptosporidium* spp and *G. duodenalis* in pigs, cats, cattle and wild-life infection were determined using nested-PCR. The genotype of the pathogens was identified by DNA sequencing of the PCR products. For *T. gondii* detection in cat stool samples were examined using conventional PCR and *T. gondii* isolates were analyzed by multiplex nested PCR-RFLP analysis and DNA sequencing. The results will provide preliminary information of zoonotic protozoan parasites circulating in the study areas which could help to increase our understanding of host-parasite relationships.

7. Outline of research achievements

This research is divided into two objectives as described above.

Firstly, overall, 10.8% (13/120) of the samples tested positive for *T. gondii* infection by conventional PCR using *B1* gene. Of these, eight samples were isolated in Nakhon Nayok province, and five samples were isolated in Kanchanaburi province. All 13 positive samples had 92.94%–100% similarity with *T. gondii* reference sequences in the GenBank database. Using Mn-PCR-RFLP typing, four positive samples were successfully genotyped using at least four genetic markers. For one sample, amplification was successful for eight markers: SAG1, (5' + 3')-SAG2, alt.SAG2, SAG3, GRA6, C22-8, C29-2, and L358. Amplification was achieved for four markers, namely SAG1, (5' + 3')-SAG2, alt.SAG2, and SAG3, for another sample. Amplification for six markers (alt.SAG2, SAG3, GRA6, C22-8, C29-2, and L358) was observed for two samples. Genotyping for *T. gondii* of the positive samples revealed the presence of types I (two samples) and III (one sample) in Kanchanaburi province, whereas one sample from Nakorn Nayok province was isolated as type II. The manuscript of this work is now “under review” process.

Secondly, *Cryptosporidium* spp. was detected in 12 of 67 pig samples and there was no positive in other animals. For *G. duodenalis* was detected in 4 samples of pig, 2 samples of cat and 8 samples of wildlife. DNA sequencing for genotypes identification is in progress. *Cryptosporidium* spp. and *G. duodenalis* detection in animals are summarized in Table 1. **(If the results of DNA sequencing are satisfied, the manuscript will be prepared for publication).**

Pathogens	Infected animals	No. of positive/ No. of samples
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Pig	12/67
<i>G. duodenalis</i>	Pig	4/67
	Cat	2/80
	wildlife	8/175

8. Publication of research achievements

Manuscript for the detection and genetic characterization of *T. gondii* infection in cats in Thailand is submitted to Heliyon journal (SJR; Q1) on 12 March 2025 and is now “under review” process (Manuscript Number: HELIYON-D-25-04115).

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2025.5.28

Project no: 2024-joint-13

1. Principal investigator

Name: Berdikulov Atabek

Position: Researcher

Affiliation: Kyrgyz Research Institute of Veterinary Named After A. Duisheev, Togolok-Moldo 60, Bishkek 720033, Kyrgyzstan

2. Project title:

Identification of tick vectors, including novel and genotype-specific species, that transmit *Theileria equi* and *Babesia caballi*

3. Collaborating research group members at NRCPD

Name: Naoaki Yokoyama

Position: Professor (WOAH expert for equine piroplasmosis)

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

04/01/2024 – 03/31/2025, one year

5. Purposes and objectives

Equine piroplasmosis, a leading cause of economic losses in the horse industry, is an infectious disease caused by *Theileria equi* and *Babesia caballi*. Implementing a systematic strategy for tick control, with a focus on specific tick vectors, is crucial for effectively managing equine piroplasmosis. The efficacy of these strategies could be improved by addressing potential new tick vectors and those that transmit the virulent parasite genotypes in endemic countries. Our recent study revealed the prevalence of *T. equi* and *B. caballi* infections among horses in Kyrgyzstan. However, the specific tick vectors transmitting these parasites remain unknown. Therefore, the objectives of this study were to 1) identify specific tick vectors, including potentially novel ones, involved in the transmission of *T. equi* and *B. caballi* in Kyrgyzstan and 2) determine the tick vectors responsible for transmitting the specific parasite genotypes.

6. Outline of research process

Questing ticks were collected from the pastures and vegetation around the horse farms, where our recent study identified *T. equi* and *B. caballi*-positive horses, throughout Kyrgyzstan. The collected

ticks preserved in ethanol and transferred to NRCPD, where they were subjected to species identification based on morphological keys and then to DNA extraction. All of the tick DNA samples were initially screened with specific PCR assays for detecting *T. equi* and *B. caballi*, to identify specific tick vectors transmitting these parasite species. To investigate if the transmission vectors are genotype-specific, positive samples are undergoing further analysis using PCR assays developed at NRCPD that specifically target *T. equi* and *B. caballi* genotypes. Selected PCR amplicons will be sequenced, and the obtained sequences will undergo phylogenetic analyses to validate the findings.

7. Outline of research achievements

We collected a total of 394 questing ticks were using a flagging method from six of seven Kyrgyz provinces, including 69 in Batken, three in Osh, 219 in Jalal-Abad, 21 in Talas, 77 in Chuy, and five in Issyk-Kul. Among them, 329 were adults, two were nymphs, and 63 were larvae. Morphological identification classified the adult ticks into seven species: *Haemaphysalis punctata* (n=318), *H. sulcata* (n=2), *Rhipicephalus sanguineus* (n=2), *Hyalomma dromedarii* (n=2), *H. rufipes* (n=1), *Dermacentor marginatus* (n=3), and *D. silvarum* (n=1). The two nymphs were identified as *H. punctata*. The morphological identification of tick species was confirmed by analysis of *cox1* gene sequences of tick origin. Subsequently, all tick DNA samples were screened with specific PCR assays for detecting *T. equi* and *B. caballi*. The PCR-positive samples are currently being screened with genotypic-specific PCRs, followed by sequencing analyses to verify the findings.

8. Publication of research achievements

Upon completion of this study, a manuscript summarized the findings will be submitted to a peer-reviewed scientific journal.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月2日

採択番号	2024 共同-14		
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・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	2024年4月1日 ~ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>アクアポリン(Aquaporin, AQP)は水輸送に関わる分子であり、哺乳類だけでなく植物や真菌にも保存され、近年では種々の病原性原虫においても同定されている。<i>Plasmodium berghei</i>において、AQP欠損原虫のマウスに対する病原性が有意に減弱したことから(Promeneur et al., PNAS, 2007)、病原性における機能も注目されている。トキソプラズマにおいても AQP(TgAQP1)は同定されており、水輸送に関わることが示されている(Pavlovic-Djuranovic et al., FEBS Lett., 2003)。さらに、TgAQP2と予測される遺伝子もデータベースに登録されている。しかし、これらの病原性に対する役割は不明である。申請者は昨年度までの共同研究により、TgAQP1とTgAQP2のそれぞれのノックアウト原虫株(ΔTgAQP1株、ΔTgAQP2株)の病原性がやや減弱した程度であったのに対し、両方のAQPをノックアウトしたダブルノックアウト原虫(ΔTgAQP1ΔTgAQP2株)の病原性が顕著に減弱することを見出した。今年度の研究では、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>実験1 親株である Pru ΔKu80 株、ΔTgAQP1 株、ΔTgAQP2 株およびダブルノックアウト株である ΔTgAQP1 ΔTgAQP2 株を 1000 個、24 ウェルプレートに培養した HFF 細胞に接種した。10 日後に固定し、クリスタルバイオレットで細胞を染色しプラーク形成能を比較した。</p> <p>実験2 親株である Pru ΔKu80 株、ΔTgAQP1 株、ΔTgAQP2 株およびダブルノックアウト株である ΔTgAQP1 ΔTgAQP2 株を 24 ウェルプレートに培養した HFF 細胞に接種した。</p>		

	<p>接種 1 時間後に細胞を洗浄し、界面活性剤で膜透過処理したのち原虫を蛍光免疫染色によって可視化した。寄生胞内における原虫数を計数することで、分裂能を評価した。</p>																									
<p>研究成果の概要</p>	<p>実験 1 プラーク形成能を比較したところ、いずれの KO 株もそのプラーク形成能は親株と同等であった(右図 A)。すなわち、AQP はトキソプラズマの細胞障害性には大きく関わらない可能性が示された。</p> <p>実験 2 感染細胞内(寄生胞内)における各 KO 株の分裂能を比較したところ、寄生胞内に内包される原虫数の割合はいずれの株も同等であった。すなわち、AQP は原虫の分裂能にも大きく関与しない可能性が示された。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="842 309 1394 672"> <p>A</p> </div> <div data-bbox="849 672 1401 1128"> <p>B</p> <table border="1"> <caption>Parasite number / vacuole distribution (%)</caption> <thead> <tr> <th>Strain</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>4</th> <th>8</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PruΔKu80</td> <td>~85</td> <td>~10</td> <td>~5</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>PruΔAQP1</td> <td>~85</td> <td>~10</td> <td>~5</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>PruΔAQP2</td> <td>~85</td> <td>~10</td> <td>~5</td> <td>~0</td> </tr> <tr> <td>PruΔAQP1ΔAQP2</td> <td>~85</td> <td>~10</td> <td>~5</td> <td>~0</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div>	Strain	1	2	4	8	PruΔKu80	~85	~10	~5	~0	PruΔAQP1	~85	~10	~5	~0	PruΔAQP2	~85	~10	~5	~0	PruΔAQP1ΔAQP2	~85	~10	~5	~0
Strain	1	2	4	8																						
PruΔKu80	~85	~10	~5	~0																						
PruΔAQP1	~85	~10	~5	~0																						
PruΔAQP2	~85	~10	~5	~0																						
PruΔAQP1ΔAQP2	~85	~10	~5	~0																						
<p>研究成果の発表</p>	<p>Tatsunori Masatani, Taizo Saito, Maho R. Takahashi, Misuzu Okajima, Xuenan Xuan, Naoto Ito. Investigation of the involvement of Toxoplasma Aquaporin 1 and Aquaporin 2 in the pathogenicity of mice 投稿準備中</p>																									

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月30日

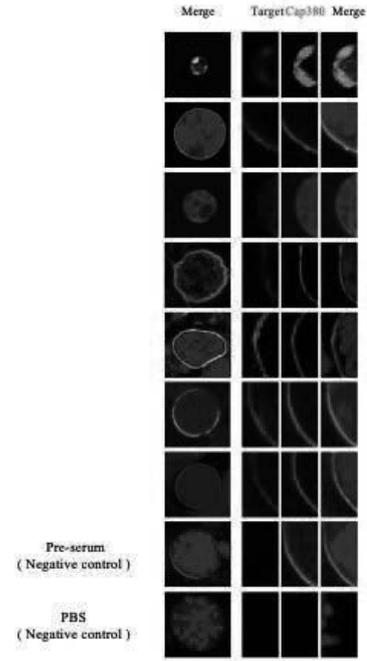
採択番号	2024 共同-15		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本 晋也
研究課題名	マラリア原虫 <i>Brca2</i> のスポロゾイト形成における機能の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	よしかわ やすなが 吉川 泰永	北里大学獣医学部・准教授・研究総括	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本 晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授 (役割分担) マラリア原虫の遺伝子発現操作	
研究期間	2024年4月1日 ~ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>我々はネズミマラリア原虫(<i>Plasmodium berghei</i>)において相同組換えに貢献する <i>Brca2</i> のノックアウト原虫を作製した。<i>Brca2</i> のノックアウト原虫では、赤内型原虫の増殖率とガメートサイト形成率が減少した。さらにノックアウト原虫において雌ガメートサイトへの分化が抑制され、オーカイネート形成数とオーシスト形成数が減少した。特にスポロゾイトが無形成であり、<i>Brca2</i> はネズミマラリア原虫の生活環の維持、特にスポロゾイト形成に必須であることを示した。本研究では、マラリア原虫のスポロゾイト形成に <i>Brca2</i> がどのように貢献しているのか解明することを一つの目的とした。さらにマラリア原虫 <i>Brca2</i> の <i>in vitro</i> の機能解析は全く報告されていない。マラリア原虫 <i>Brca2</i> の分子メカニズムの解明を目指して、<i>in vitro</i> の実験系により DNA との相互作用を解析することも試みる。</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 を発現するネズミマラリア原虫 (<i>Plasmodium berghei</i>) に <i>Brca2</i> 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。また、<i>in vitro</i> の実験を行うために <i>Brca2</i> のアミノ酸配列の一部を組換えタンパク質として大腸菌を用いて精製することを試みた。</p> <p>9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>		
研究成果の概要	<p><i>Brca2</i> の一部のドメインを強制発現させることでドミナントネガティブ効果を調べるために EGFP 発現ネズミマラリア原虫における強制発現実験を行った。共同研究者の福本先生のアドバイスを得つつ、実験を行っているが、残念ながら現在までに組換えマラリア原虫の作出には至っていない。</p> <p><i>Brca2</i> の機能ドメインのリコンビナントタンパク質を解析する実験系において、大腸菌における発現ベクターに <i>Brca2</i> の DNA 結合ドメインをコードする領域をクローニングした。</p>		

	<p>このベクターを用いて、<i>Brca2</i> の DNA 結合領域を His タグ融合タンパク質として発現させることを試みた。大腸菌において <i>Brca2</i> の DNA 結合ドメインを強制発現し、His タグ融合タンパク質を精製できることを確認した。しかしながら、タンパク質の収量が非常に少なく、<i>in vitro</i> の実験に用いるだけのタンパク質量を得ることが出来ていない。これは、大腸菌破碎後に不溶性画分に多くの組換えタンパク質が存在しているためであることが予想されている。そこで、現在、可溶性画分における組換えタンパク質量を増加させるために大腸菌にシャペロン遺伝子を導入して、精製を試みている。今後、組換えタンパク質を精製し、様々なタイプの DNA との相互作用を解析する予定である。</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

2025年4月28日

採択番号	2024 共同-16		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	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	2024年4月1日 ~ 2025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。</p>		
研究経過の概要	<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、原虫感染に対して重要な防御免疫応答を起こす時期である。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ため、以下の検討を実施した。</p> <p>申請者は媒介蚊に GFP 発現マラリア原虫のオーカイネートをマイクロインジェクションすることによりオーシスト感染モデルを作製した。このモデルは感染後成熟期(感染 10-15日)のオーシストを蚊の中腸細胞を含めずに GFP 蛍光を確認しながら容易に単離回収できる特徴がある。</p> <p>単離回収オーシストの壁構成蛋白質の探索のため粗精製したオーシスト壁蛋白質画分を用いて、LC-MS/MS によるショットガンプロテオミクス解析を実施した。その結果、オーシスト壁に存在する壁構成蛋白質および輸送タンパク質の候補が複数得られた。これらの候補タンパク質について、ペプチド抗体を作製し、免疫蛍光抗体法および共焦点レーザー顕微鏡を用いてその局在を確認した。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p>媒介蚊にマラリア原虫オーキネートをマイクロインジェクションすることにより感染モデルを作製した。このモデルは感染後成熟期(感染 10-15 日)のオーシストを蚊の中腸細胞を含めずに GFP 蛍光を確認しながら容易に単離回収できる特徴がある。さらに、本感染により形成されたオーシスト内のスポロゾイトは正常に分化・発育していることも確認された。</p> <p>オーシスト壁の多くは不溶化すると考えられることから、2000 個のオーシスト内の可溶化成分除去を凍結融解により行ない、この粗精製したオーシスト壁蛋白質画分を用いて、LC-MS/MS によるショットガンプロテオミクス解析を網羅的に実施し、オーシスト壁構成蛋白質の同定を試みた。197 種の原虫蛋白質が得られ、GO 解析、SOSUI 解析、Probability 75%以上など選別を行った。</p> <p>本解析結果には、既知のオーシスト壁の表面蛋白質 PbCap380 および構成蛋白質 CSP が含まれていることを確認し、最終的に 5 種のトランスポーター蛋白質と 4 種の新規オーシスト壁構成蛋白質の情報が得られた。</p> <p>これら 9 種タンパク質について抗血清を作成し、共焦点レーザー顕微鏡によりオーシストにおける局在解析を実施した(右図)。並行して発現動態解析のための KO 原虫作成等、順次研究を進めている。</p> 
<p>研究成果の発表</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Nakayama, K., Haraguchi, A., Hakozaiki, J., Nakamura, S., Kusakisako, K., Ikadai, H.* 2024. The C-terminal region of the <i>Plasmodium berghei</i> gamete surface 184-kDa protein Pb184 contributes to fertilization and male gamete binding to the residual body. <i>Parasit. Vectors</i> 17: 304. 2. Haraguchi, A., Takano, M., Fujiwara, K., Hakozaiki, J., Nakayama, K., Nakamura, S., Yoshikawa, Y., Fukumoto, S., Kusakisako, K., Ikadai, H.* 2024. Searching for new molecules involved in <i>Anopheles</i> mosquitoes' response to <i>Plasmodium</i> infection. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> 86: 485-492. 3. Haraguchi, A., Takano, M., Hakozaiki, J., Nakayama, K., Nakamura, S., Yoshikawa, Y., Fukumoto, S., Kusakisako, K., Ikadai, H.* 2023. Formation of free oocysts in <i>Anopheles</i> mosquitoes injected with <i>Plasmodium</i> ookinetes. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> 85: 921-928. 4. Haraguchi, A., Gonda, M., Nakayama, K., Fujiwara, K., Hakozaiki, J., Nakamura, S., Kusakisako, K., Ikadai, H.* 2024. Effect of a bloodmeal on <i>Plasmodium</i> oocyst growth using the enema-injection method. <i>Vector Borne Zoonotic Dis.</i> in press. 5. Boonyakida, J., Nakayama, K., Kusakisako, K., Ikadai, H., Park, E.Y. 2024. Dual display of <i>Plasmodium yoelii</i> circumsporozoite surface protein and merozoite surface protein-1 on norovirus-like particles. <i>Bioconjug. Chem.</i> 35: 1933-1943.

- | | |
|--|--|
| | <p>6. Obayashi, M., Kimura, M., Haraguchi, A., Gotanda, M., Kitagawa, T., Matsuno, M., Sakao, K., Hamanaka, D., Kusakisako, K., Kameda, T., Ibrahim, H. R., Ikadai, H.*, Miyata, T.* 2024. Bovine lactoferrin inhibits <i>Plasmodium berghei</i> growth by binding to heme. <i>Sci. Rep.</i> 14: 20344.</p> |
|--|--|

NRCPD-OUAVM Joint Research Report

Date: 2025.5.27

Project no: 2024-joint-17

1. Principal investigator

Name: Kishor Pandey

Position: Associate Professor

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

2. Project title:

Molecular detection of tick-borne pathogens in Cattle from Kathmandu, 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)

04/01/2024 – 03/31/2025, one year

5. Purposes and objectives

The purpose of this study is to investigate the presence and distribution of tick-borne pathogens (TBPs) mainly *Babesia* and *Theileria* species in cattle within Dolakha District, Nepal. TBPs pose a significant threat to livestock health and productivity, particularly in rural areas where veterinary resources may be limited. The objective of the study is to utilize molecular techniques to detect and identify the TBPs transmitted by ticks affecting cattle in this region. This research aims to provide baseline data that can support effective disease management strategies, improve animal health, and contribute to the development of targeted control and prevention programs in Nepal.

6. Outline of research process

The study was conducted at Cattle Genetic Resource Centre (CGRC) which is situated at the Jiri Valley, Dolakha district, Nepal at altitude of 1935 meters above sea level. The study area is located in the Himalayan region which has a cooler climate and diverse topography, which influences tick infestation and disease prevalence. These cattle graze on open pasture land near the CGRC. The blood samples were collected from each cattle in sterile conditions. Three ml blood was taken from jugular vein of each cattle. Thin blood smears were prepared, fixed with methanol, and stained with Giemsa. The smears were observed under a microscope for the detection of TBPs. DNA was extracted from

each blood sample and subjected to PCR analysis to detect the presence of specific TBPs. Positive samples will be further analyzed through sequencing to confirm pathogen identity.

7. Outline of research achievements

The study was conducted to detect the types of tick-borne pathogens (TBPs) affecting cattle farm at himalayan region of Nepal, Nepal using molecular methods. A total of 80 blood samples were collected from cattle at CGRC, Dolakha, Nepal in year 2023 and 2024. Thin blood smears were prepared and observed under the microscope. DNA was extracted using commercial DNA extraction kit. PCR, cloning and sequencing were performed to detect and identify TBPs present in the collected samples. This study revealed that 66 (77.5%) were positive for piroplasm (*Babesia* spp. and *Theileria* spp.) via PCR. We were able to identify the species as *B. bigemina*, *B. bovis*, and *T. orientalis* by PCR followed by sequencing. The sequencing revealed distinct nucleotide sequences of *Babesia* in 42 samples. Specifically, *B. bovis* was seen in 20 samples and *B. bigemina* was seen in 22 samples. Similarly, 10 *T. orientalis* were seen in 10 samples. Thirteen samples were clone to see co-infection and result showed 2 samples showed *B. bovis* and *B. bigemina* co-infection. Similarly, one sample showed *B. bovis* and *T. orientalis*. The result is the first to detect co-infection of two parasites using sequencing of clone samples in Nepal.

In addition, the author has collaboration with Dr. Asada in other parasites and recently we published paper on canine demodicosis.

8. Publication of research achievements

Bhusal R, Gompo TR, Sugi T, **Asada M, Pandey K (2025)**. Canine Demodicosis in Rupandehi Nepal's Street Dogs: Prevalence, Clinical Signs, and Hematology. *Vet Sci.* 12(3):238. doi: 10.3390/vet-sci12030238.

Canine Demodicosis in Rupandehi Nepal's Street Dogs: Prevalence, Clinical Signs, and Hematology

Rachana Bhusal ¹, Tulsi Ram Gompo ², Tatsuki Sugi ³, Masahito Asada ⁴, Kishor Pandey ¹

Affiliations

Affiliations

- 1 Central Department of Zoology, Institute of Science and Technology, Tribhuvan University, Kathmandu 44601, Nepal.
- 2 Central Veterinary Laboratory, Kathmandu 44600, Nepal.
- 3 Division of Collaboration and Education, International Institute for Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo 001-0020, Japan.
- 4 National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan.

PMID: 40266949 PMCID: PMC11946785 DOI: 10.3390/vetsci12030238

Abstract

Canine demodicosis is a contagious skin disease caused by the over-proliferation of *Demodex* mites in the host's hair follicles. This study examines the prevalence, clinical signs, and hematological changes associated with demodicosis in street dogs of Rupandehi, Nepal. Between August 2023 and January 2024, 100 skin scrapings were collected from each street dog presenting dermatological symptoms.

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年6月4日

採択番号	2024 共同-18		
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	2024年4月1日 ～ 2025年3月31日		
目的・趣旨	<p>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、軟体動物及び甲殻類などで散見される。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。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、全ゲノム情報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、海棲哺乳類に寄生する本原虫の感染動態を明らかにすることである。本研究の成果は、原虫生態系の情報は公衆衛生・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>昨年度は、襟裳に生息する 65 頭のゼニガタアザラシ試料を用い、以下を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 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 2. PCR によるトキソプラズマ特異的 DNA 断片の検出 3. ゼニガタアザラシ心臓ホモジネートのマウスへの経口投与 <p>以上を実施し、ゼニガタアザラシ血清を用いた ELISA 法を確立した。また、トキソプラズマ特異的な PCR 増幅産物が 65 頭中 10 頭で検出されたが、マウスへの陽性個体心臓のホモジネート投与では感染が確認されなかった。以上より、今年度は、ELISA によるゼニガタアザラシのトキソプラズマ感染率の調査、マウス感染に向けたシスト保存温度と保存の検討などを行う必要があると考えられた。</p>		
研究成果の概要	<p>今年度は、襟裳の 115 頭分のゼニガタアザラシ試料を用いて解析を行った。結果と考察を以下に示す。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ELISA 法によるトキソプラズマ感染率の調査 <p>昨年度の本共同研究助成により確立した ELISA 法を用いた。ゼニガタアザラシの血清は、2023 年度に採取した 37 試料及び 2024 年度に採取した 60 試料を用いた。その</p>		

	<p>結果、計 97 試料のうち 6 試料が陽性であった(陽性率 6.2%)。北海道におけるゼニガタアザラシの血清を用いたトキソプラズマ感染の調査は 2007 年に報告がある(Fujii ら、<i>J Vet Med Sci</i>)。この報告では、2005 年の納沙布の調査で 77 頭中 3 頭が陽性であったが、襟裳では 1999 年(8 頭)、2003 年(15 頭)、2004 年(28 頭)、2005 年(24 頭)のいずれの年にもトキソプラズマ陽性個体が検出されていない。そのため、襟裳のゼニガタアザラシにトキソプラズマ感染が拡大している可能性もあり、今後も継続的な調査が必要であると考えられた。</p> <p><u>2. シストの保存条件の検討</u></p> <p>昨年度、トキソプラズマ PCR 陽性ゼニガタアザラシの心臓ホモジネートを用いたマウスへの感染実験を実施したが、感染マウスが確認されなかった。これより、ゼニガタアザラシより心臓を摘出した後の試料の保存方法がシストの感染能に影響を与えている可能性が考えられたため、シストの保存条件を検討した。トキソプラズマシストは、当研究室でマウスへの経口投与で継代を行っている脳ホモジネート中の Fukaya 株のシストを用いた。保存条件は、温度条件 4℃もしくは室温、保存期間 1、2、3 及び 4 日間で検討した。通常、千葉大学で維持している Fukaya 株は、マウスへのシスト 10 個の経口投与で急性感染を引き起こし、投与後 14 日間以内でマウスが斃死する。上記の条件で保存したシストをマウスに経口投与したところ、室温、4℃の温度条件で 1、2、3 日間保存したシストでは 12 日以内のマウス斃死が確認された。これより、これらの条件では、シストの感染能が維持されているものと考えられた。一方、4 日間保存したシストを投与したマウスは生存したが、投与後 2 ヶ月に脳内においてシストが確認されたことから、感染能が低下したことが考えられた。以上の結果より、ゼニガタアザラシより採取した心臓試料にトキソプラズマシストが存在した場合、室温でも 4℃でも 3 日間は感染能を有していることが示唆された。この成果は、今後のトキソプラズマのゼニガタアザラシ分離株の確立に向けた実験に活用できる。</p> <p><u>3. ゼニガタアザラシの心臓ホモジネートを用いたマウスへの感染</u></p> <p>昨年度はホモジネートの経口投与のみで感染を試みたが、今年度は、経口投与と同時に腹腔内接種も実施した。また、上述の 2. で得られた結果をもとに心臓試料分離後 3 日以内にホモジネートを作成しマウスへの感染を実施したが、トキソプラズマの感染は確認されなかった。保存条件に問題がなかったとすると、ホモジネート作成に用いた心臓部位にシストが存在しなかった可能性があり、今後は、心臓試料の採取箇所の検討が必要と考えられた。</p>
研究成果の発表	なし

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2025年5月21日

採択番号	2024 共同-19		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	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	
	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	
	さかもと ともひろ 坂本 知優	早稲田大学先進理工学部・4年 活性化化合物のプローブ化	
	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・准教授	
研究期間	2024年4月1日 ~ 2025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おり、依然として新たな治療薬の開発が求められている。そこで本研究では抗トリパノソーマ活性化化合物の分子プローブ化による作用メカニズムの解明を行うことを目的とする。</p> <p>具体的には、抗トリパノソーマ活性を有することが知られている化合物の分子プローブ化を行う。得られたプローブを蛍光標識化して細胞内における化合物の局在を確認するとともに、プローブをビーズと結合させることで原虫抽出物からタンパク質のプルダウンを行い、解析することで標的タンパク質の推定を行う。</p> <p>研究代表者は研究分担者と協力して化合物の精製・分子プローブ化・作用メカニズム解明を担当し、貴センター菅沼啓輔准教授が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>大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿(S07140)から <i>T. evansi</i> および <i>T. congolense</i> に対し強い活性(IC₅₀ = 0.60, 0.61 μg/mL)を示す新規アルカロイドが得られている。この化合物の作用メカニズム解明のために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た。合成したプローブを用いて、原虫抽出物からタンパク質のプルダウンを行い、LC-MS/MS 解析を行った結果、標的タンパク質の候補として6種類のタンパク質が推定された。</p> <p>一方、薬用植物として知られる春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> 内に含まれる抗トリパノソーマ活性化化合物 coronarin D についても、作用メカニズム解明のために標的タンパク質</p>		

	<p>の探索に用いるプローブ分子の合成を行った。合成したプローブを用いて、標的タンパク質の同定を目指し研究を進めている。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>大島新曾根産 <i>Theonella</i> 属海綿(S07140)から単離した新規アルカロイドについて、分子プローブを合成した。得られたプローブを蛍光標識化して化合物の細胞内局在を確認したのち、ビーズに結合させてトリパノソーマ原虫抽出物からのタンパク質のプルダウン実験を実施し、SDS-PAGE を行った。その後バンドを切り出し、LC-MS/MS 解析を行った結果、標的タンパク質の候補として 6 種類のタンパク質が同定された。今後はマウスを用いた <i>in vivo</i> 活性試験での評価を行うとともに、化学プローブを用いて再度タンパク質のプルダウン実験を行って再現性を確認する。また、並行し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、埼玉産春ウコン <i>Curcuma aromatica</i> 抽出物に含まれる抗トリパノソーマ活性化合物 coronarin D (IC₅₀=1.5 μM) について、分子プローブを合成した。得られたプローブをビーズに結合させ、トリパノソーマ原虫抽出物からのタンパク質のプルダウン実験を実施し、SDS-PAGE を行った。今後は MS/MS 解析によって標的タンパク質の同定を行ったのち、パスウェイ解析を行うことで化合物の作用メカニズム解明を目指す。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>1. 坂本知優, 菅沼啓輔, 大枝一喜, 中村文彬, 中尾洋一, 『抗トリパノソーマ活性化合物 coronarin D の分子プローブ化の検討』, 第 94 回日本寄生虫学会大会, 東京, 2025 年 3 月</p>