

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2026 年 5 月 31 日

採択番号	2025 共同-19		
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・獣医寄生虫学ユニット・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	2025 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	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 70 nm 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。		
研究経過の概要	本課題は 2024 年度からの継続課題であり、前年度は非感染赤血球を用いた iU-ExM の予備実験と並行して原虫の移管と培養順化を実施した。2025 年度は原虫感染赤血球を用いた U-ExM 法と iU-ExM 法の手法を検討した。U-ExM 法を用いて原虫の細胞核と赤血球膜を染色し、細胞核の面積及び赤血球膜の周囲の長さの画像解析を実施した。U-ExM 法では観察対象の拡大及び蛍光シグナルが観察された。一方で、iU-ExM 法により明視野条件下で原虫感染赤血球を膨張させることには成功したものの、十分な蛍光シグナルの検出には至らなかった。今後は抗体の反応濃度、反応タイミング等の検討を行い、iU-ExM 法が実用可能な実験系であるかを精査していく。		
研究成果の概要	今年度は原虫感染赤血球を用いた U-ExM 法と iU-ExM 法の手法を検討した。U-ExM 法を用いて原虫の細胞核と赤血球膜を核染色試薬と細胞膜染色試薬を用いて染色し、細胞核の面積及び赤血球膜の周囲の長さを ImageJ を用いた画像解析を実施した。U-ExM 法により得られた結果は、拡大処理を行っていない対照群と比較して、細胞核の面積にして約 4 倍、赤血球膜周囲の全長は約 3 倍となった。さらに、iU-ExM 法により明視野条		

	件下で原虫感染赤血球が約 12 倍に膨張することは確認できたものの、十分な蛍光シグナルの検出には至らなかった。今後は蛍光プローブ・抗体の反応濃度、反応タイミング等の検討を行い、実用可能な実験系としての確立を目指す。
研究成果の 発表	本共同研究で得られた研究手法を用いた局在解析結果を今後国際誌へ投稿予定である。