

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580456

研究課題名(和文)パベシア原虫の増殖および薬剤耐性獲得における熱ショックタンパク質90の役割の解明

研究課題名(英文)The role of Babesia gibsoni heat shock protein 90 on the proliferation and the drug resistance.

研究代表者

山崎 真大 (Yamasaki, Masahiro)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40322846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では犬の住血寄生原虫であるBabesia gibsoniの熱ショック蛋白質90(BgHsp90)に関する基礎的研究を実施した。BgHsp90の遺伝子をクローニング、塩基配列の解析を行い、抗BgHsp90抗体の作成を行った。これらを用いて遺伝子発現量の測定を行い、BgHsp90が原虫の増殖に貢献していること、原虫が熱ショックを受けたときに発現量が増加することを明らかにした。また、熱ショックタンパク質90阻害薬により、B. gibsoniの増殖を抑制することが可能であり、BgHsp90は治療のターゲットとなることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, Heat shock protein 90 (Hsp90) in Babesia gibsoni, a blood protozoa in dogs, was analyzed. The Babesia gibsoni heat shock protein 90 (BgHsp90) gene was cloned and sequenced. Moreover, anti recombinant BgHsp90 antibody was developed. Additionally, the expression of BgHsp90 was observed. As results, it was shown that BgHsp90 might contribute the proliferation of the parasites, and that the expression of BgHsp90 would be elevated when the parasites were exposed to the high temperature. Meanwhile, Hsp90 inhibitors could suppress the proliferation of B. gibsoni in vitro. This result suggested that the BgHsp90 should be one of the drug targets for the treatment of canine babesiosis.

研究分野：獣医内科学

キーワード：パベシア症 Babesia gibsoni 熱ショックタンパク質90 クローニング リアルタイムRT-PCR ウェスタンブロッティング 熱ショックタンパク質90阻害薬

1. 研究開始当初の背景

バベシア原虫はマダニにより媒介され哺乳動物に感染することで発熱や溶血性貧血を主徴とする家畜バベシア症を引き起こす。家畜バベシア症は世界中で報告されており、産業動物においては多大な経済的損失を引き起こし、ペットにおいては重大な健康被害を引き起こす。本症はワクチンなどの有効な予防法がまだなく、治療法も様々なものが利用されているが、感染動物からのバベシア原虫の排除は難しく再発を繰り返すため、その制圧が多くの研究者の目標となっている。

熱ショックタンパク質 90 (heat shock protein 90; hsp90) は分子量が約 90 キロダルトンの分子シャペロンであり、細胞が熱によるストレスにさらされた時に発現量が増加するタンパク質の一種として発見された。hsp90 は、新しく合成されたタンパク質が正しく立体構造をとり重合する(folding)のに必須のタンパク質であり、細胞のシグナル伝達、増殖、生存に関わる多くのタンパク質の活動に関与している。この分子は細菌や真菌、原虫などさまざまな微生物にも存在することが明らかになってきている。マラリア原虫ではその hsp90 が薬物療法の標的候補として考えられてきている(Kumar et al., 2003)。また、トリパノソーマ原虫が哺乳動物宿主と節足動物のベクターの間を伝播する際にも生存と発育に重要な役割を担っていることが指摘されている。このように、hsp90 は原虫の増殖や生存に重要であることから、抗原虫薬の標的分子として注目されている。これらのことから、バベシア原虫においても hsp90 は生存と発育に重要なタンパク質であることが予想されるが、バベシア原虫の hsp90 に関する報告はほとんど存在しない。しかしながら、他の原虫と同様に、バベシア原虫の hsp90 の構造や機能を解析することは新しい抗バベシア原虫薬の開発につながるものと考えられた。

2. 研究の目的

申請者らは、イヌに感染するバベシア原虫、*Babesia gibsoni* を用いて研究を行ってきており、近年、抗バベシア原虫薬の一種であるジミナゼン製剤に耐性を持つ株の作成に成功した(Hwang et al. 2010)。本研究課題では、このジミナゼン耐性株と野生株を利用し、研究期間内に以下のことを明らかにしようとした。

(1) *B. gibsoni* の野生株とジミナゼン耐性株から hsp90 遺伝子をクローニングし、予想されるアミノ酸配列とともにその構造を比較する。

(2) hsp90 は動物細胞では熱、化学物質などによるストレスにより発現量が増加することがわかっている。そこで、リアルタイム

PCR により *B. gibsoni* hsp90 の遺伝子転写量を定量する系を、抗 *B. gibsoni* hsp90 抗体を作成してウエスタンブロッティングによりタンパク質発現量を定量する系を構築し、熱、抗バベシア原虫薬、酸化障害などのストレスに対する *B. gibsoni* hsp90 の発現量の変化を観察することで、その基礎的な機能を解析する。

(3) *B. gibsoni* hsp90 の発現量を、上記の方法を用いて野生株とジミナゼン耐性株で比較し、薬剤耐性獲得における hsp90 の役割を明らかにする。

(4) ゲルダナマイシンやその類縁体などの hsp90 阻害剤を用いて *B. gibsoni* hsp90 を阻害し、*B. gibsoni* の野生株およびジミナゼン耐性株の増殖や生存を観察、比較する。これにより、バベシア原虫の生存と増殖における hsp90 の役割を観察する。

以上の研究を行い、*B. gibsoni* hsp90 の構造、基礎的機能、薬剤耐性獲得における役割について解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *B. gibsoni* hsp90 遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

培養原虫から mRNA を抽出し、*B. gibsoni* hsp90 (BgHsp90) 遺伝子のクローニングおよびその塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列は予想されるアミノ酸配列と共に他の原虫、哺乳動物などの hsp90 遺伝子と構造を比較し、さらにイントロンの存在の有無も解析した。

(2) ストレス環境下における hsp90 遺伝子転写量および蛋白質発現量の測定

培養 *B. gibsoni* を様々なストレスに暴露し、その時の hsp90 遺伝子転写量と原虫の増殖、生存を測定した。hsp90 遺伝子転写量の測定は、定量的リアルタイム RT-PCR およびウエスタンブロッティング法を用いて実施した。ストレス環境としては、1) 高温暴露、2) 低温暴露、3) 抗バベシア原虫薬のジミナゼン製剤、および 4) 活性酸素などによる酸化障害を利用した。

(3) 野生株およびジミナゼン耐性株における *B. gibsoni* hsp90 発現量の比較

定量的リアルタイム RT-PCR、およびウエスタンブロッティング法を利用して、*B. gibsoni* の野生株およびジミナゼン耐性株における *B. gibsoni* hsp90 発現量を測定し、比較した。

(4) hsp90 阻害剤の *B. gibsoni* 増殖に及ぼす影響の観察

hsp90 の阻害剤であるゲルダナマイシンとその類縁体を用いて hsp90 の機能を阻害し、野生株においてその増殖と生存を観察した。すなわち、*B. gibsoni* の野生株を、ゲルダナ

して、ゲルダナマイシン、17-AAG の両方とも原虫の増殖を抑制したが、原虫数の変化から算出した 50% 阻害濃度はゲルダナマイシンが 0.557 μM であったのに対し、17-AAG は 7.44 μM であり、ゲルダナマイシンの方が抗原虫効果が高いことが示された (図 4, 5)。今後は、これらの薬の副作用についても検討しなくてはならないが、ゲルダナマイシンは効果が高い代わりに副作用も強いことが予想される。しかしながら、これらの薬剤は原虫の増殖を抑制することが可能であり、新規抗原虫薬の候補であると考えられた。

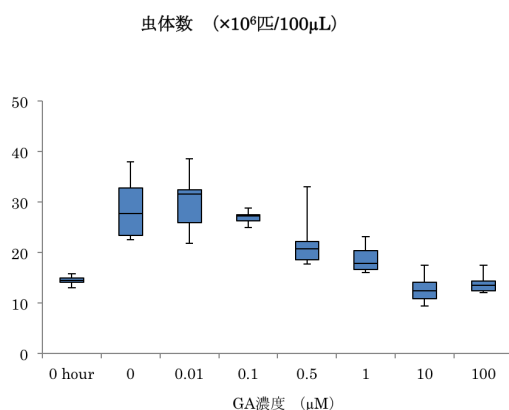


図 4 . ゲルダナマイシン添加後の *B. gibsoni* 虫体数の変化

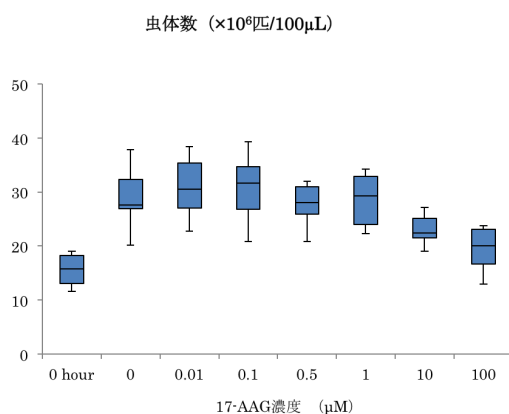


図 5 . 17-AAG 添加後の *B. gibsoni* 虫体数の変化

以上の研究から、BgHsp90 の遺伝子の解析に成功し、その発現量の変化を検出するための方法を確立した。近年、原虫においてもその hsp90 に関する報告は増えてきているが、機能に関する報告はほとんど無い。本研究で確立した方法は、hsp90 の機能を解析するために有用であり、今後これらの方法を活用してさらなる解析を進める予定である。また、hsp90 阻害薬は原虫の増殖を抑制することが明らかになり、今後副作用に関する研究は必要であるものの、hsp90 阻害薬はバベシア症の新規治療薬となり得るため、さらなる研究を行う予定である。これらの研究を押し進めることで、原虫のストレス応答が解明さ

れていくと共に、新規治療薬の開発につながることを期待される。さらに、この研究で得られた所見は *B. gibsoni* のみならず他のバベシア原虫さらには他の近縁の原虫の hsp90 に関する研究においても強いインパクトを与えることが期待される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masahiro Yamasaki, Eriko Harada, Yu Tamura, Sue Yee Lim, Tatsuyuki Ohsuga, Nozomu Yokoyama, Keitaro Morishita, Kensuke Nakamura, Hiroshi Ohta, Mitsuyoshi Takiguchi, In vitro and in vivo safety and efficacy studies of amphotericin B on *Babesia gibsoni*, Veterinary Parasitology, 査読あり、Vol. 205、3-4 巻、2014、424-433 DOI:10.1016/J.vetpar.2014.09.005.

〔学会発表〕(計 3 件)

山崎 真大、坪井 嘉啓、大田 寛、滝口 満喜、*Babesia gibsoni* 熱ショックタンパク質 90 の遺伝子クローニングおよび系統樹解析、第 82 回日本寄生虫学会大会、2013.3.30、東京医科歯科大学(東京都)
井高 菜月、山崎 真大、大田 寛、滝口 満喜、ジミナゼン耐性 *Babesia gibsoni* の熱ショックタンパク質 90 遺伝子発現量の測定、第 156 回日本獣医学会学術集会、2013.9.20、岐阜大学(岐阜市)
阿部 萌子、山崎 真大、大田 寛、滝口 満喜、犬バベシア症治療における熱ショック蛋白質 90 の薬剤標的としての可能性、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014.9.10、北海道大学(札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 真大 (YAMASAKI, Masahiro)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：40322846

(2) 研究分担者

大田 寛 (OHTA, Hiroshi)
北海道大学・(連合) 獣医学研究科・講師
研究者番号：50431333

滝口 満喜 (TAKIGUCHI, Mitsuyoshi)
北海道大学・(連合) 獣医学研究科・教授
研究者番号：70261336

(3) 連携研究者

()

研究者番号：