

令和 6 年 9 月 27 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06398

研究課題名（和文）我が国のヒトバベシア症病原体における多様性の解明

研究課題名（英文）Genetic investigation of Babesia parasites in Japan

研究代表者

新倉 綾 (Nikura, Aya)

国立感染症研究所・安全管理研究センター・主任研究官

研究者番号：10392325

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトに感染性がある、あるいは感染の可能性がある原虫のゲノム解析を行った。アピコンプレックス門最小である、既報の*B. microti* RI株（6.5Mb）と、3系統の*Babesia microti*（Hobetsu, US, Kobe）、および姉妹種の*B. rodhaini*の染色体本数は一致したが、そのサイズは大きく異なり、13.5%の開きがあった（最小6.0Mb）。また、遺伝子予測により、極小イントロンが（19～25nt）ゲノム全体に散在していることや、系統間ではサイズ分布に違いがある事などもわかり、*B. microti* groupのゲノム多様性が初めて明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Babesia microti*は約6億年前にピロプラズマ目（赤血球に感染し、ダニが媒介する寄生虫）の他の原虫よりも早く共通祖先から分化した。日本で分離された複数の*B. microti*ゲノム解析から、そのサイズが約6.0Mbとアピコンプレックス門最小であること、僅かな真核生物種で見つかっていない～25ntの極小イントロンがゲノム全体に散在していること、特有のミトコンドリア構造をもつこと、これらは系統間で多様であることなどが明らかとなった。さらに解析を進めることで、原虫が効率の良い代謝・増殖能力を獲得し、環境変化に柔軟に適応してきたプロセスを、ゲノム進化から解明できる可能性が見えてきた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the genomes of three strains of *Babesia microti* (Hobetsu, US, and Kobe), which were isolated from field mice and transmitted by different vectors ticks in Japan. The sister species, *B. rodhaini*, was included in this study. The number of chromosomes was the same as that of the previously reported smallest apicomplexan, *B. microti* RI strain (6.5 Mb). However, their sizes differed greatly, with a 13.5% gap (6.0 Mb minimum). Gene prediction revealed the presence of tiny introns (19-25 nt), which were scattered throughout the genome. There were differences in size distribution among the strains. This study reveals for the first time the genomic diversity of the *B. microti* group.

研究分野：獣医学

キーワード：Babesia

## 1. 研究開始当初の背景

*Babesia* を含むピロプラズマ目の原虫は、哺乳類の赤血球に感染し、マダニによって媒介される。*Babesia microti* によるヒトバベシア症は、米国を中心に世界中で最も症例数が多く、輸血感染も認められる。本原虫集団は 18SrRNA 遺伝子配列でみると 0.7-0.8% の違いしか認められないため、世界中に分布する *B. microti* は単一の原虫種とみなされてきた。これに対し、 $\alpha$ -tubulin 及び CCT7 などの進化速度の早いマーカー遺伝子の開発と、原虫の網羅的解析によって、*B. microti* は遺伝的多様性をもった大きな原虫集団であり (*B. microti* group) 5 つかそれ以上のグループを内包していることが明らかとなってきた。さらに、*B. microti* group の各系統は、媒介するマダニの種類も明確に区別されることから、生物学的にもそれぞれが独立した集団であり、各グループは亜種レベルで下位分類するのが妥当と考えられる。

さらに、*B. microti* group 自体も、実はピロプラズマ目の *Babesia* あるいは *Theileria* と異なる第 3 の原虫群として、属レベルの新規分類が妥当である事が示唆されている。この背景として、1. 特有のミトコンドリアゲノム構造やライフサイクル (白血球ステージを欠き、介卵感染しない) 2. CCT7 遺伝子のイントロンの位置及びサイズマトリックスで示された *B. microti* group の生物学的な特殊性がある。つまり、*B. microti* group は CCT7 遺伝子では、12 個のイントロンの位置マトリックスの固有のパターンと、僅かな原生動物種でしか発見されていない 25bp 以下の極小サイズのイントロンが認められる。この現象が、ゲノム全般にみられるのか、また、グループ内の原虫間でも多様性があるのか不明である。

近年、*Babesia* 属を含むピロプラズマ目原虫の集団的遺伝構成の解析は進んできた。しかし、情報は断片的で、解明が十分進んだと言える状況ではない。特に、*B. microti* group については、全ゲノム解読されたのは、米国の 1 系統 (US-lineage) 7 株のみで、それらは US-lineage の中の US sub-lineage という非常に狭い集団に属する (日本の US-lineage は Asia sub-lineage) 属レベルの新規分類が妥当であることを裏付けるゲノム情報は不足しており、*B. microti* group 内外の進化関係を明確にするたえにも、解析例数を増やし、解析範囲をゲノム全体に広げる必要がある。

日本では、ヒト、野生動物、マダニから 5 タイプもの *B. microti* group 原虫が見つかっており、世界的に見てこれほど多様性に富んだ原虫種が分布する国はない。特に、*B. microti* group に含まれる系統のうち KOBE-、HOBETSU-、US-lineage の 3 系統は、媒介マダニに加え抗原性も全く異なる。さらに、ヒトへの感染が証明あるいは示唆されており、野生小型げっ歯類等から、実験動物によって分離、保存されている。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、*B. microti* group における遺伝的多様性やピロプラズマ目内における系統関係を明らかにするため、新規ゲノム配列の決定と、染色体解析、遺伝子予測、オーソログ遺伝子解析、イントロン予測等の解析を行った。

## 3. 研究の方法

原虫種 *B. microti* group の 3 系統 (Kobe-、Hobetsu-、US-lineage) について解析した。*B. microti* の姉妹種で *B. microti* group に含まれる *B. rodhaini* Australian 株 (National Bio Resource Project : NBRP から分与) を解析に含めた。

原虫ゲノム DNA および RNA の抽出：感染赤血球を含む末梢血液をマウス、ハムスターあるいはラットから採取し、OptiPrep を用いた密度勾配遠心分離と、さらに Plasmodipur カラム (Europroxima) を用いたろ過により、宿主の白血球を除去した。OptiPrep は HEPES で調整し、Iodixanol として最終濃度 13.6% とした。最終精製赤血球を用いて、濃厚塗抹標本を作成し、残留した宿主白血球を顕微鏡下でカウントし

た。5cells/uL 以下の WBC を含むサンプルのみを、原虫ゲノムおよび totalRNA 抽出に供した。NucleoBond CB500 (MACHEREY-NAGEL) および ISOGEN-LS (日本遺伝子) を用い、標準プロトコルに従い核酸を抽出した。

シーケンスデータ取得、ゲノム配列構築および遺伝子予測：PacBio ライブラリ、イルミナライブラリ、および RNAseq ライブラリの作製、およびシーケンシングは外部受託サービスを利用した。実施条件は、1 . Short read : TruSeq DNA PCR Free Kit, Novaseq6000 Paired End 150bp 4Gb; 2 . Long read : SMRTbell Template Prep Kit 20Kb, PacBio RS II, 1.5Gb; 3 . RNAseq : TruSeq stranded mRNA Library Kit, Novaseq6000, Paired End 100bp, 4Gb。なお、Long read については一部、HiFi リード (PacBio\_Sequel II ~ 1.5Gb) を実施した。得られた Illumina paired end リードと Pac Bio ロングリードから、de novo アセンブリによりコンティグ配列を得た。BRAKER2 等のプログラムにて原虫ゲノムの構造アノテーションを行った。Single copy ortholog 遺伝子 (BUSCO version 5.2.1 : aconoidasida\_odb10 および apicomplexa\_odb10) を指標にした評価を行った。

染色体ゲノムの確認 (パルスフィールド電気泳動)：上記の方法で採取した抹消血を 0.15% サポニンで透過処理し、洗浄後のペレットを TE に懸濁した。約  $5 \times 10^8$ /mL 前後の原虫濃度となるよう等量のアガロース (1.2%) (Clean Cut Agarose, Biorad) と混合した。プラグモールドで固化させたプラグを SDS/EDTA バッファー (1% SDS, 0.5M EDTA) およびプロテイナーゼ K 緩衝液 (2mg/ml プロテイナーゼ K, 0.5M EDTA, pH8.0, 1% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム, 0.2% デオキシコール酸ナトリウム) を用いて、除タンパク処理を 3 日間行った。Bio-rad CHFF Mapper XA を用い、0.8% アガロースゲル、チオウレアを含む TAE バッファー、温度 14 の条件下で泳動した。CHFF の設定は、DNA サイズ 1Mb-4Mb を入力値として設定された、auto algorithm とした (ブロック 1、電圧 2.0V/cm、泳動時間 53 時間 19 分、パルスタイム 20 分 ~ 29 分 45 秒、ブロック 2、電圧 2.0V/cm : 泳動時間 6 時間 42 分、パルスタイム 1 分 18.93 秒 ~ 2 分 25.98 秒)。ゲル染色を SYBR Gold で行い、CCD カメラで映像を取り込んだ。

#### 4 . 研究成果

##### アピコンプレックス門最小の染色体ゲノムと多様性

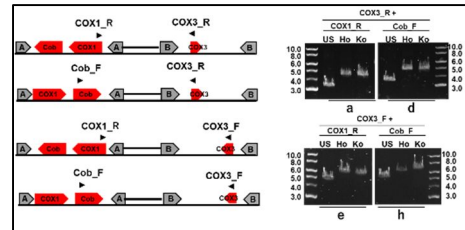
*B. rodhaini*, *B. microti* US, Hobetsu, Kobe、すべて 4 本の contig が生成され、その本数は既報の *B. microti* RI (GCA\_000691945.2) のそれと一致していた。BUSCO v5.2.1 で評価したアピコンプレックス門に共通する single copy orthologs (apicomplexa\_odb10, n=446) は protein 96.7% 以上, genome 94.1% 以上であり、高い品質であることが確認された (図 1)。染色体ゲノムのサイズ等について表 1 に示す。PFGE による染色体の泳動像は、一部近似サイズの分離限界が認められたが、予測サイズとほぼ一致していた (図 2)。これまでに配列決定されたすべてのアピコンプレックス門のなかで、RI の核ゲノムは、寄生虫の中で最小であり、4 つの染色体を持つことが示されている。本研究で得られた、in silico および in vitro の結果より、このグループの原虫の染色体本数は 4 本であること、その合計サイズは、6.0Mb (Hobetsu lineage) 6.8Mb (US) とサイズに 1 割強の違いがあることが明らかとなった。



次に、*B. microti* グループ内外の系統関係について、オルソログ遺伝子群(n=446)を用いて系統解析を行った。*B. microti* グループは、バベシア属やタイレリア属よりも、初期に分岐し、*B. rodhaini* を含む単独のクレードを形成した(図3)。

### ミトコンドリアゲノムの多様性

既報の *B. microti* (11.1 kb) および *B. rodhaini* (6.9 kb) のミトコンドリアゲノムゲノムは直鎖状である。1分子内に2組の逆向き繰り返し配列(IR、図のA、B)が含まれ、IRで挟まれた上流と下流の領域でそれぞれ逆位が認められる。したがって、4パターンのゲノム構造をとり、これは、上記2種特有の構造である。PCR解析によって、増幅産物のサイズと本数を確認したところ、*B. microti* group でも、同様のゲノム構造をとる傾向があること、しかし、US, Hobetsu, Kobe lineageのIRのサイズは、それぞれ異なることが示された(図4)。Cob, cox1, Cox3の3つの蛋白質コード遺伝子の予測は、RIと一致していた。



### イントロンサイズの多様性

上記アノテーションを行ったオルソログ遺伝子群(n=446)のイントロンについて解析を行ったところ、多くが極端に短く19-25nt長に集中していた(極小イントロン)(図5)。一方で、同一遺伝子内に極小イントロン以外のイントロンも混在していた。広範な生物種が保有するオルソログ遺伝子を抽出してイントロン・エキソン構造を詳細に比較したところ、イントロンの位置はよく保存されていたがサイズに違いがあった。とくに、*B. rodhaini*は確認した15個のイントロンすべてが極小イントロンだったのに対し、RIはそのうち6個が44nt-356ntに延長し(平均262.5nt)、さらに、Brに認められない21ntと23ntの2個の挿入がRIには見られた。核遺伝子全体に散在する極小イントロンは、二杯虫や繊毛虫などわずかな真核生物でしか確認されていない。本研究から、*B. rodhaini*を含め、*B. microti*-groupの原虫は、アピコンプレクサ最小の、多様性に富んだゲノムを保有しており、ゲノム縮小化と寄生に特化して進化してきたことが推測させる。本原虫集団が、微生物の進化プロセスを理解するためのモデル生物となる可能性があり、さらなる解析が必要である。

本研究は、国立遺伝学研究所・豊田敦博士(シークエンス、ゲノム解析)、千葉大学・高橋弘喜博士(ゲノム解析)、国立感染症研究所・鈴木里和博士(PFGE)との共同研究により実施した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 新倉（座本）綾	4. 巻 36(2)
2. 論文標題 ヒトバベシア症	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 バムサジャーナル	6. 最初と最後の頁 56-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zamoto-Niikura Aya, Saigo Akiko, Sato Masahiko, Kobayashi Hiroataka, Sasaki Mizuki, Nakao Minoru, Suzuki Tadaki, Morikawa Shigeru	4. 巻 8
2. 論文標題 The presence of Ixodes pavlovskyi and I. pavlovskyi borne microorganisms in Rishiri Island: an ecological survey	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msphere.00213-23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zamoto-Niikura Aya, Hagiwara Katsuro, Imaoka Koichi, Morikawa Shigeru	4. 巻 0
2. 論文標題 Genetic investigation of GPI anchored Bd37 orthologs in Babesia divergens group and use of recombinant protein for ecological survey in deer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.03.19.585777	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zamoto-Niikura A, Hagiwara K, Imaoka K, Morikawa S, Ishihara C, Hanaki KI.	4. 巻 23
2. 論文標題 Epidemiological Survey of Babesia divergens Asia Lineage in Wild Sika Deer (Cervus nippon) by Using Direct PCR in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 68-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2019.096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zamoto-Niikura Aya, Hagiwara Katsuro, Imaoka Koichi, Morikawa Shigeru, Ishihara Chiaki, Hanaki Ken-Ichi	4. 巻 73
2. 論文標題 Epidemiological Survey of Babesia divergens Asia Lineage in Wild Sika Deer (Cervus nippon) by Using Direct PCR in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 68 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2019.096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sayama Yusuke, Zamoto-Niikura Aya, Matsumoto Chieko, Saijo Masayuki, Ishihara Chiaki, Matsubayashi Keiji, Nagai Tadashi, Satake Masahiro	4. 巻 58
2. 論文標題 Analysis of antigen-antibody cross-reactivity among lineages and sublineages of Babesia microti parasites using human babesiosis specimens	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 1234 ~ 1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.14558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 新倉 綾、高橋 弘喜、豊田 敦、鈴木 里和、筏井 宏実、花木 賢一
2. 発表標題 アピコンプレクサ門最小のBabesia rodhainiのゲノム解析
3. 学会等名 第167回日本獣医学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 新倉 (座本) 綾、本間 健一、中山 健史、小林 進太郎、好井 健太郎
2. 発表標題 Babesia原虫の抗体保有調査
3. 学会等名 第166回日本獣医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Aya Zamoto-Niikura
2. 発表標題 Development ELISA system based on recombinant Bd37 proteins of Babesia divergens Asia-lineage
3. 学会等名 Human Babesiosis Meeting III (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐山勇輔、新倉(座本)綾、松本千恵子、西條政幸、松林圭二、永井正、佐竹正博
2. 発表標題 シリアンハムスターにおけるヒトバベシア症原因原虫Babesia microti (Kobe-typeおよびUS-type)の感染動態
3. 学会等名 第66回日本輸血・細胞治療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A. Zamoto-Niikura, Imaoka K, Morikawa S, Hagiwara K, Ishihara C, Hanaki K
2. 発表標題 Genetic polymorphism and amino acid sequence variation of Babesia divergens Bd37 in Ixodes persulcatus and Cervus nippon in Japan
3. 学会等名 Human babesiosis meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zamoto-Niikura A, Imaoka K, Morikawa S, Hagiwara K, Ishihara C, Hanaki K.
2. 発表標題 Molecular analysis of Bd37 of Babesia divergens in Japan.
3. 学会等名 European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	Oniris, INRAE, BIOEPAR			
米国	Texas A&M university			