

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580334

研究課題名 (和文) 糖鎖認識を基点としたバベシア原虫の赤血球侵入分子機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of erythrocyte recognition and invasion by *Babesia* parasites

研究代表者

横山 直明 (YOKOYAMA NAOAKI)

国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：80301802

研究成果の概要 (和文)：バベシア原虫による赤血球侵入時に、“シアル酸やヘパラン硫酸”が赤血球膜上の感染受容体として重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、いくつかの新たな原虫側リガンド候補分子が同定された。原虫リガンド分子と感染受容体の特異相互作用を介入できる糖鎖誘導体やリガンド分子に対する特異抗体の効果は、未だ治療法や予防法のないバベシア症の新規薬剤や新規ワクチンの開発に有用な知見や材料を提供している。

研究成果の概要 (英文)：Sialic acids and Heparan sulfate located on erythrocytes were demonstrated to play important roles as infectious receptors in the erythrocyte invasion by *Babesia* parasites. In contrast, several protozoan proteins were also identified as new protozoan ligand candidates. Effects of glycoconjugates or specific antibodies on interfering the specific interactions between the protozoan ligands and erythrocyte receptors would provide us novel knowledge or materials for the development of chemotherapeutic and preventive measures against babesiosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：寄生体生物

1. 研究開始当初の背景：未だに治療法や予防法のないバベシア症を克服するためには、バベシア原虫が持つ独自の赤血球侵入分子機構を理解し、治療法・予防法の開発に繋がる重要なそのターゲット分子を同定していくことが急務となっていた。

2. 研究の目的：本研究の目的は、未だ明らかとされていない糖鎖認識を基点としたバベシア原虫の赤血球侵入機構を分子レベルで解読しようとするものであった。

3. 研究の方法: (1) バベシア原虫による試験管内培養法やマウス実験感染モデル系を用いて、各種糖鎖誘導体による原虫増殖抑制試験を行った。(2) 膜上のシアル酸を除去した赤血球や赤血球膜上のシアル酸が著しく減少したグライコフォリンAノックアウトマウスを用いて、バベシア原虫の感染試験を行った。(3) 各種バベシア原虫のcDNAライブラリーから原虫側リガンド分子のクローニングと機能解析を行った。

4. 研究成果: 研究期間中に、(1) “ α -2-シアルルクトース、ヘパリン、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、フコイダン、及びコンドロイチン硫酸” がバベシア原虫の赤血球侵入を有意に介入し阻害することをつきとめた。また、(2) シアル酸が欠如した赤血球にはバベシア原虫は侵入できないことも明らかとなった。これらの成果より、上記糖鎖誘導体群と構造上類似した“シアル酸やヘパラン硫酸”が赤血球膜上の感染受容体として重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、(3) 新たな原虫側リガンド候補としてP200(*B. bigemina*)、P0とHSP70(*B. gibsoni*)、Bv36(*B. bovis*)、及びBboP67(*B. bovis*)などが同定された。これらの分子はワクチン候補抗原として期待される。原虫リガンド分子と感染受容体の特異相互作用を介入できるそれら糖鎖誘導体や特異抗体の効果は、未だ治療法や予防法のないバベシア症の新規薬剤や新規ワクチンの開発に有用な知見や材料を提供していると考えられる。

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 34 件: すべて査読有)

1. AbouLaila, M., Nakamura, K., Govind, Y., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Evaluation of the *in vitro* growth-inhibitory effect of epoxomicin on *Babesia* parasites. *Vet. Parasitol.*, 167: 19-27, 2010.
2. AbouLaila, M., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, 169: 45-50, 2010.
3. AbouLaila, M., Sivakumar, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Inhibitory effect of terpene nerolidol on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitology International*, 59: 278-82, 2010.
4. Iseki, H., Zhou, L., Kim, C., Inpankaew, T., Sununta, C., Yokoyama, N., Xuan, X., Jittapalapong, S., and Igarashi, I.: Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. *Vet. Parasitol.*, In press.
5. Takabatake, N., Iseki, H., Ikehara, Y., Kanuka, H., Yokoyama, N., Sekimizu, K., and Igarashi, I.: Isolation and pathogenic characterization of an OBl variant of *Babesia rodhaini* which has a glycoprotein A-independent pathway to murine red blood cells. *Vet. Parasitol.*, 159:97-104, 2009.
6. Altangerel, K., Alhassan, A., Iseki, H., Sivakumar, T., Damdinsuren, B., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol. Res.*, 105:249-54, 2009.
7. Tanaka, M., Sakurai, T., Yokoyama, N., Inoue, N. and Kawazu, S.: Cloning and Characterization of Peroxiredoxin in *Babesia bovis*. *Parasitol. Res.*, 105: 1473-1477, 2009.
8. Terkawi, M.A., Aboge, G., Jia, H., Goo, Y.K., Ooka, H., Yamagishi, J., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Igarashi, I., Kawazu, S.-I., Fujisaki, K., Xuan, X.: Molecular and immunological characterization of *Babesia gibsoni* and *Babesia microti* heat shock protein-70. *Parasite Immunol.* 31:328-340, 2009.
9. AbouLaila, M., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Inhibitory effect of (-)-Epigallocatechin-3-gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitology*, 22: 1-7, 2009.
10. Sivakumar, T., Khukhuu, A., Alhassan, A., AbouLaila, M. R. A., Iseki, H., Ota, N., Lijia, Z., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Expression analysis of a *Babesia bovis* BboP67 gene homologous to the *Theileria parva* p67 gene. *J. Protozool. Res.*, 19: 62-71, 2009.
11. Munkhjargal, T., AbouLaila, M. R. A., Sivakumar, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Inhibitory effect of apicidin on *in vitro* and *in vivo* growth of *Babesia* parasites. *J. Protozool. Res.*, 19: 41-49, 2009.

12. Ishigame, T., Takabatake, N., Iseki, H., Ota, N., Koyama, A., Igarashi, I., Nishikawa, Y., Ikehara, Y., Kojima, N., and Yokoyama, N.: Effect of oligomannose-coated liposome-based vaccine on rodent babesiosis. *J. Protozool. Res.*, 19: 10-23, 2009.
13. Khukhuu, A., Sivakumar, T., Alhassan, A., Ota, N., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: The *Babesia bovis* BvP36 gene is expressed at least in the asexual stage of *Babesia* merozoite. *J. Protozool. Res.*, 19: 34-41, 2009.
14. Kim, C., Blanco, L. B. C., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Vet. Parasitol.*, 151: 158-163, 2008.
15. Kim, C., Blanco, L. B. C., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., and Igarashi, I.: Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine Babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78: 117-121, 2008.
16. Iseki, H., Takabatake, N., Ota, N., Ishigame, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: *Babesia*: the protective effects of killed *Propionibacterium acnes* on the infections of two rodent *Babesia* parasites in mice. *Exp. Parasitol.* 118: 543-548, 2008.
17. Terkawi, M. A., Zhang, G., Jia, H., Aboge, G., Goo, Y. K., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Igarashi, I., Kawazu, S. I., Fujisaki, K., and Xuan, X.: C3 contributes to the cross-protective immunity induced by *Babesia gibsoni* phosphoriboprotein P0 against a lethal *B. rodhaini* infection. *Parasite Immun.*, 30: 365-370, 2008.
18. Sivakumar, T., Aboulaila, M. R. A., Khukhuu, A., Iseki, H., Alhassan, A., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: *In vitro* inhibitory effect of fosmidomycin on the asexual growth of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *J. Protozool. Res.*, 18: 71-78, 2008.
19. Okubo, K., Yokoyama, N., Takabatake, N., Okamura, M., and Igarashi, I.: Amount of cholesterol in host membrane affects erythrocyte invasion and replication by *Babesia bovis*. *Parasitology*, 134: 625-30, 2007.
20. Alhassan, A., Thekisoe, O. M., Yokoyama, N., Inoue, N., Motloang, M. Y., Mbatia, P. A., Yin, H., Katayama, Y., Anzai, T., Sugimoto, C., and Igarashi, I.: Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. *Vet. Parasitol.* 143: 155-60, 2007.
21. Okamura, M., Yokoyama, N., Takabatake, N., Okubo, K., Ikehara, Y., and Igarashi, I.: Modification of host erythrocyte membranes by trypsin and chymotrypsin treatments and effects on the *in vitro* growth of bovine and equine *Babesia* Parasites. *J. Parasitol.* 93: 208-211, 2007.
22. Okamura, M., Yokoyama, N., Takabatake, N., Okubo, K., Ikehara, Y., and Igarashi, I.: *Babesia bovis*: Subcellular localization of host erythrocyte membrane components during their asexual growth. *Exp. Parasitol.*, 116: 91-4, 2007.
23. Alhassan, A., Govind, Y., Tam, N. T., Thekisoe, O. M. M., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *In vitro* culture methods for diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitol. Res.*, 100: 1165-8, 2007.
24. Nakamura, K., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Cyclin-dependent kinase inhibitors block erythrocyte invasion and intraerythrocytic development of *Babesia bovis in vitro*. *Parasitology*, 134: 1347-53, 2007.
25. Okubo, K., Yokoyama, N., Govind, Y., Alhassan, A., and Igarashi, I.: Effects of Cysteine Protease Inhibitors on *In Vitro* Growth. *Exp. Parasitol.* 117: 214-7, 2007.
26. Alhassan, A., Iseki, H., Kim, C., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Comparison of Polymerase chain reaction methods for the detection of *Theileria equi* infection using whole blood compared to pre-extracted DNA samples as PCR templates. *Trop. Anim. Health Prod.* 39: 369-74, 2007.
27. Takabatake, N., Okamura, M., Yokoyama, N., Okubo, K., Ikehara, Y., and Igarashi, I.: Involvement of a host erythrocyte sialic acid content in *Babesia bovis* infection. *J. Vet.*

- Med. Sci. 69: 999-1004, 2007.
28. Kim, C., Alhassan, A., Verdida, R. A., Yokoyama, N., Xuan, X., Fujisaki, K., Kawazu, S, and Igarashi, I.: Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. *Vet. Parasitol.* 148: 137-43, 2007.
 29. Takabatake, N., Okamura, M., Yokoyama, N., Ikehara, Y., Akimitsu, N., Arimitsu, N., Hamamoto, H., Sekimizu, K., Suzuki, H., and Igarashi, I.: Glycophorin A-knockout mice, which lost sialoglycoproteins from the red blood cell membrane, are resistant to lethal infection of *Babesia rodhaini*. *Vet. Parasitol.* 148: 93-101, 2007.
 30. Kim, C., Iseki, H., Maria Shirley Herbas, Yokoyama, N., Suzuki, H., Xuan, X., Fujisaki, K., and Igarashi, I.: Development of Taqman-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 837-41, 2007.
 31. Terkawi, M. A., Jia, H., Gabriel, A., Goo, Y. K., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Igarashi, I., Fujisaki, K., Xuan, X.: A shared antigen among *Babesia* species: ribosomal phosphoprotein P0 as a universal babesial vaccine candidate. *Parasitol. Res.* 102: 35-40, 2007.
 32. Bork, S., Yokoyama, N., Hashiba, S., Nakamura, K., Takabatake, N., Okamura, M., Ikehara, Y., and Igarashi, I.: Asexual growth of *Babesia Bovis* is inhibited by specific sulfated glycoconjugates. *J. Parasitol.* 93: 1501-1504, 2007.
 33. Iseki, H., Alhassan, A., Ohta, N., Thekisoe, O. M. M., Yokoyama, N., Inoue, N., Nambota, A., Yasuda, J., and Igarashi, I.: Development of a Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (mLAMP) Method for the Simultaneous Detection of Bovine *Babesia* Parasites. *J. Microbiol. Methods*, 71: 281-7, 2007.
 34. Kuboki, N., Tiwananthagorn, W., Takagi, H., Nakayama, T., Xuan, X., Inoue, N., Igarashi, I., Tsujimura, K., Ikehara, Y., Kojima, N., and Yokoyama, N.: Preliminary evaluation of oligomannose-coated liposome vaccines against lethal protozoan infections in mice. *J. Protozool. Res.*, 17: 9-15, 2007.
- [学会発表] (計 18 件)
1. 玉城志緒、井関博、周麗佳、小山亜紀、横山直明、Jittapalapong Sathaporn、五十嵐郁男: ウシバベシア 2 種を同時に診断可能なプロテインアレイの開発、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 26 日-28 日、武蔵野
 2. Terkawi M. Alaa、Seuseu Junior、AbouLaila Mahmoud、横山直明、玄学南、五十嵐郁男: Molecular characterization of a new spherical body protein of *Babesia bovis* and evaluation its potential use for serodiagnosis、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 25 日-27 日、鳥取
 3. 横山直明: バベシア原虫の赤内型増殖に関する分子生物学的研究(日本獣医学会賞受賞講演)、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 2 日-4 日、栃木
 4. 井関博、Chul-min Kim、斉藤あつ子、簗田友香、猪熊 壽、横山直明、五十嵐郁男: ヒトバベシア症の簡易迅速血清診断法の開発、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 2 日-4 日、栃木
 5. 田中みほ、櫻井達也、井上 昇、横山直明、玄学南、河津信一郎: バベシア原虫における遺伝子改変技術の開発、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 2 日-4 日、栃木
 6. 横山直明、石亀貴士、高島規之、井関 博、太田奈保美、小山亜紀、五十嵐郁男、西川義文、池原 譲、小島直也: バベシア症に対するオリゴマンノース糖鎖被覆リポソームワクチンの効果、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 2 日-4 日、栃木
 7. 周 麗佳、井関 博、Tawin Inpankaew、横山直明、玄学南、Sathaporn Jittapalapong、五十嵐郁男: タイにおけるウシバベシア症の疫学調査第 156 回日本獣医学会学術集会、2008 年 9 月 24 日-26 日、宮崎
 8. Abou-Laila, M., Sivakumar, T., Yokoyama, N., and Igarashi, I.: Growth inhibitory effect of terpene nerolidol against *Babesia* parasites. 第 156 回日本獣医学会学術集会、2008 年 9 月 24 日-26 日、宮崎
 9. 横山直明: バベシア原虫と宿主赤血球膜シアル酸分子の関わりについて、第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15 日-14 日、金沢

10. 横山直明、高島規之、井関 博、池原 讓、五十嵐郁男：マウスバベシア原虫と宿主赤血球膜シアル酸分子の関わりについて、第 77 回日本寄生虫学会大会、2008 年 4 月 3 日～4 日、長崎
11. 横山直明、Chul-min Kim、Lidia Blanco、Andy Alhassan、井関博、玄学南、五十嵐郁男：Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. 第 145 回日本獣医学会学術集会、2008 年 3 月 28 日～30 日、相模原
12. 田中みほ、櫻井達也、横山直明、井上昇、川津信一郎： *Babesia bovis* 2-Cys 型ペルオキシレドキシンのクローニングと機能解析、第 145 回日本獣医学会学術集会、2008 年 3 月 28 日～30 日、相模原
13. Naoaki Yokoyama： Involvement of host sialic acids in erythrocyte invasion of *Babesia* parasites. The 3rd International Zoonosis Seminar, 2007 年 11 月 29 日～30 日、Jeju-Do, Korea
14. Abou-Laila Mahmoud、中村一哉、Govind Yadav、横山直明、五十嵐郁男： Epoxomicin inhibits the *in vitro* growth of *Babesia* parasites. 第 144 回日本獣医学会学術集会、2007 年 9 月 2 日～4 日、江別
15. 高島規之、井関博、池原讓、関水久、横山直明、五十嵐郁男： Glycophorin A ノックアウトマウス内で増殖する *Babesia rodhaini* の分離、第 144 回日本獣医学会学術集会、2007 年 9 月 2 日～4 日、江別
16. Bork-Mimm, S., Das, S., Okubo, K., Yokoyama, N., Igarashi, I., and Pfister, K.: Effects of protein kinase inhibitors on the *in vitro* growth of *Babesia bovis*. The 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2007. 8. 19-23, Belgium
17. 横山直明、岡村雅史、高島規之、太田奈保美、池原讓、五十嵐郁男：バベシア原虫と宿主赤血球膜分子の関わりについて、第 15 回分子寄生虫学ワークショップ、2007 年 7 月 25 日～28 日、草津
18. 大久保和洋、横山直明、五十嵐郁男： Effects of Cysteine Protease Inhibitors on the *In Vitro* Growth of *Babesia bovis*. 第 143 回日本獣医学会学術集会、2007 年 4 月 3 日～5 日、つくば

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 直明 (YOKOYAMA NAOAKI)
国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
研究者番号：80301802

(2) 研究分担者

五十嵐 郁男 (IGARASHI IKUO)
国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号：80159582