

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850199

研究課題名(和文)バベシア原虫赤血球侵入機構の可視化

研究課題名(英文)Bioimaging analysis on erythrocyte invasion mechanisms of Babesia bovis

研究代表者

麻田 正仁 (ASADA, Masahito)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：40587028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：バベシアはアピコンプレクサ門の原虫であり、ウシを始めとする家畜の赤血球に寄生することでバベシア症を引き起こす。本研究ではバベシア原虫の赤血球遊出から赤血球侵入の分子メカニズムの解析を行った。本研究により、同原虫における複数遺伝子改変技術を開発したほか、滑走運動に関わるとされる原虫遺伝子のノックアウトによる表現型、原虫遊出へのカルシウムイオンの関与についてバイオイメージングを用い明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Babesia bovis is an intraerythrocytic apicomplexan parasite, which is transmitted by ticks and causes the disease bovine babesiosis in cattle. In this study, we developed transfection system on B. bovis by using double selection with WR99210 and blasticidin-S, which enables us to perform double transfection in the parasite. Then, we analyzed gliding motility of B. bovis merozoite by disrupting TRAP gene families. Moreover, we analyzed the egress mechanism of the parasite. We found egress was artificially induced in vitro using calcium ionophore A23187 and thapsigargin which increase Ca(2+) concentration in the cytosol of the parasite cells. These finding will contribute to develop new therapeutic strategies to bovine babesiosis.

研究分野：原虫病学

キーワード：バベシア ウシ 赤血球侵入 滑走運動 遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

バベシア症はアピコンプレクサ門バベシア属原虫による家畜の寄生虫病であり、マダニによって媒介される。特にウシのバベシア症は熱帯地域から日本を含む温帯地域に至るまで広く分布しており、畜産業に多大な経済的被害をもたらしている。バベシア原虫はウシ体内では赤血球内に寄生し、分裂増殖しては赤血球を破壊し、遊出した原虫が新たな赤血球に侵入するということを繰り返すが、原虫の赤血球遊出から赤血球侵入の詳細なメカニズムは不明であった。

我々はこれまで同原虫における遺伝子ノックアウト法を開発すると共に、緑色蛍光タンパク質を発現する原虫を作出し、イメージング解析を行った。その結果、赤血球から原虫が遊出し、その後遊出した原虫(メロゾイト)が滑走運動を行いながら、新たな赤血球へと侵入することが明らかとなった。そこで、本研究ではメロゾイトの赤血球遊出及び滑走運動の分子メカニズムをバイオイメージングを用いて解析した。

2. 研究の目的

バベシア原虫メロゾイトの赤血球遊出及び滑走運動の分子メカニズム解明を目的とした。この目的を達するため、「遺伝子改変技術の開発」では遺伝子を複数回改変する技術の確立を目的とした。「メロゾイト滑走運動の解析」では TRAP 遺伝子に着目し、メロゾイト滑走運動に関わる分子の同定を目的とした。「メロゾイト遊出の解析」ではカルシウムイオン(Ca^{2+})に着目し、メロゾイト遊出への Ca^{2+} の関与を明らかとするを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子改変技術の開発

B. bovis においては申請者らが開発した *hdhfr* 遺伝子と選択薬剤 WR99210 を用いた選択法と、*bsd* 遺伝子と選択薬剤プラスチジン S を用いた選択法が報告されている。本研究ではこれら両薬剤選択法を組み合わせた。まず、両選択法を使い、緑色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質の双方を発現する原虫を作製した。さらに、過去に作製した酸化タンパク質である細胞質局在性チオレドキシシペルオキシダーゼ(*Bbtpx-1*)遺伝子ノックアウト(KO)原虫を使い、遺伝子の相補実験を行った。

メロゾイト滑走運動の解析

バベシアと同じアピコンプレクサ門に属するマラリア原虫のスポロゾイトやトキソプラズマのタキゾイトでは Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) が原虫の滑走運動に関わるとされる。そこで、*B. bovis* ゲノムにおける TRAP 遺伝子を検索するとともに、そのシングルノックアウト原虫を作出し、その表現型を解析した。

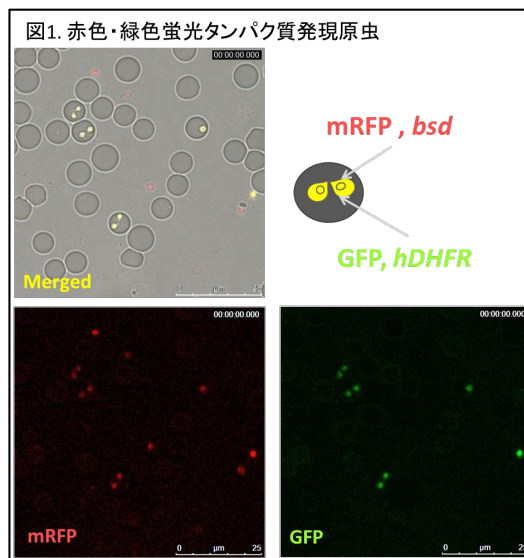
メロゾイト遊出の解析

アピコンプレクサ門原虫では原虫の遊出に Ca^{2+} が関与するという報告があることから、バベシア原虫細胞内のカルシウム濃度上昇が原虫の遊出(エグレス)を誘発するか明らかとするため、カルシウムイオノフォア A23187 を培養感染血に投与し、原虫遊出を解析した。また、 Ca^{2+} -ATPase 阻害剤として知られるタブシガルギンについてもバベシア感染血に投与して原虫遊出を解析した。

4. 研究成果

遺伝子改変技術の開発

まず *bsd* と赤色蛍光タンパク質(RFP)を融合タンパク質としてエピソームに発現させるプラスミドを構築し、WR99210 の薬剤選択で作出した GFP 発現原虫に遺伝子導入し、プラスチジン S、WR99210 による選択を行った結果、GFP と RFP の同時発現原虫の作出に成功した(図 1)。さらに、BSD-RFP 融合タンパク質発現プラスミドを基に *Bbtpx-1* 補完プラスミドを作製し、エピソーム発現ないし *Bbtpx-1* 遺伝子座に入れ戻す形で *Bbtpx-1* KO 原虫に遺伝子導入した。その結果得られた RFP 発現原虫では、双方ともゲノム、mRNA、タンパク質レベルで *Bbtpx-1* の発現が確認され、活性窒素種負荷に対する感受性の復帰も確認された。よって、バベシア原虫におけるダブルトランスフェクション法を確立することができた。



メロゾイト滑走運動の解析

TRAP ファミリータンパク質として、マラリア原虫の TRAP, MTRAP, CSP など数種類が、トキソプラズマにおいても MIC-2 などが知られており、これらのタンパク質は TSR ドメインを含む。*B. bovis* ゲノムにおいて TRAP 遺伝子を検索したところ、5 つの TRAP 遺伝子が同定された(5 つ目の TRAP5 は最終年度に同定)。そこで、TRAP3 の TSR ドメインを含む領域の組み換えタンパク質

を作製し、ウサギ抗血清を作製するとともに、TRAP1-4 についてそのシングルノックアウト原虫を作出した。抗 TRAP 抗体を使用した間接蛍光抗体法にて、TRAP タンパク質の原虫先端部(宿主細胞侵入関連タンパク質の貯蔵を担う細胞小器官近傍)における発現を確認した。また、TRAP1-4 のシングルノックアウト原虫を作製したところ、興味深いことに TRAP1-4 のシングルノックアウト原虫を得ることができ、メロゾイトの滑走運動も確認された。他のアピコンプレクサ門原虫において、TRAP 遺伝子の多くは宿主細胞侵入に必須のため、遺伝子ノックアウト原虫が得られないという報告が多い。よって、バベシアの TRAP 遺伝子は各 TRAP 遺伝子が重複的に機能しているか、他の原虫とは異なる滑走運動機構を備えていることが示唆された。

メロゾイト遊出の解析

バベシア原虫細胞内のカルシウム濃度上昇が原虫の遊出(エグレス)を誘発するか明らかとするため、カルシウムイオノフォア A23187 を培養感染血に投与し、投与後 10 分ごとに薄層塗抹標本作製し、原虫感染率を測定した。その結果、A23187 10nM 投与群において投与 10 分後に感染率の有意な低下が見られ、その後、投与 20 分、30 分後には有意な感染率の上昇が見られた。このことから、A23187 による同原虫内のカルシウムイオン濃度上昇がバベシア原虫のエグレスを誘発したことが強く示唆された。同様の現象は培養感染血にエタノールを添加した際にも起こったため、現在知られているトキソプラズマ原虫のエグレス同様カルシウム濃度上昇に関わるシグナル伝達系がこの機構に関わっていることが推測された。また、Ca²⁺-ATPase 阻害剤として知られるタブシガルギンをバベシア感染赤血球に投与しても投与直後から原虫感染率の有意な低下とその後の上昇が観察されたため、タブシガルギン感受性のオルガネラからのカルシウム放出がバベシア原虫のエグレスに関与していることが示唆された。

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 8 件)

Masatani T, Asada M, Hakimi H, Hayashi K, Yamagishi J, Kawazu S, Xuan X. Identification and functional analysis of a novel mitochondria-localized 2-Cys peroxiredoxin, BbTPx-2, from *Babesia bovis*. Parasitol Res. 2016 in press. 査読有 doi: 無し, PMID: 27095567

Hakimi H, Yamagishi J, Kegawa Y, Kaneko O, Kawazu S, Asada M. Establishment of transient and stable transfection systems

for *Babesia ovata*. Parasit Vectors. 2016; 9(1):171. 査読有
doi: 10.1186/s13071-016-1439-z.

Asada M, Yahata K, Hakimi H, Yokoyama N, Igarashi I, Kaneko O, Suarez CE, Kawazu S. Transfection of *Babesia bovis* by Double Selection with WR99210 and Blasticidin-S and Its Application for Functional Analysis of Thioredoxin Peroxidase-1. PLoS One. 2015;10(5):e0125993. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0125993.

Mossad E, Asada M, Nakatani D, Inoue N, Yokoyama N, Kaneko O, Kawazu S. Calcium ions are involved in egress of *Babesia bovis* merozoites from bovine erythrocytes J Vet Med Sci. 2015;77(1):53-8. 査読有
doi: 無し, PMID: 25298241

Hakimi H, Sukanuma K, Usui M, Masuda-Sukanuma H, Angeles JM, Asada M, Kawai S, Inoue N, Kawazu S. *Plasmodium knowlesi* thioredoxin peroxidase 1 binds to nucleic acids and has RNA chaperone activity. Parasitol Res. 2014;113(11): 3957-62. 査読有
doi: 10.1007/s00436-014-4060-0.

Masatani T, Asada M, Ichikawa-Seki M, Usui M, Terkawi MA, Hayashi K, Kawazu S, Xuan X. Cloning and Characterization of a 2-Cys Peroxiredoxin from *Babesia gibsoni*. J Vet Med Sci. 2014; 76(1): 139-143. 査読有 doi:無し, PMID: 24025459

Terkawi MA, Ratthanophart J, Salama A, AbouLaila M, Asada M, Ueno A, Alhasan H, Guswanto A, Masatani T, Yokoyama N, Nishikawa Y, Xuan X, Igarashi I. Molecular characterization of a new *Babesia bovis* thrombospondin-related anonymous protein (BbTRAP2). PLoS One 2013; 8:e83305. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0083305.

Masatani T, Ooka H, Terkawi MA, Cao S, Luo Y, Asada M, Hayashi K, Nishikawa Y, Xuan X. Identification, cloning and characterization of BmP41, a common antigenic protein of *Babesia microti*. J Vet Med Sci. 2013 ;75(7):967-70. 査読有 doi:無し, PMID: 23428774

[学会発表](計 14 件)

麻田 正仁、河津 信一郎、バベシア原虫メロゾイト滑走運動のバイオイメージング研究、第 48 回日本原生生物学会大会、2015 年 11 月 6 日～11 月 8 日、国立感染症研究所(東京都・新宿区)

Masahito Asada ら、Transfection of *Babesia bovis* by Double Selection with WR99210 and Blasticidin-S and Its Application for Functional Analysis of Thioredoxin Peroxidase-1, The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2015年9月8日~9月11日、淡路夢舞台国際会議場(淡路市)

田中 健、山岸 潤也、Hassan Hakimi、麻田 正仁、河津 信一郎、原虫とその感染症のゲノム・トランスクリプトーム解析、第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月7日~9月9日、北里大学(十和田市)

Hassan Hakimi、山岸 潤也、外川 裕人、田中 健、金子 修、河津 信一郎、麻田 正仁、Establishment of transient and stable transfection system for *Babesia ovata*, 第158回日本獣医学会学術集会、2015年9月7日~9月9日、北里大学(十和田市)

麻田 正仁ら、バベシア原虫メロゾイトの宿主赤血球遊出機構、第13回分子寄生虫学マラリア研究フォーラム合同大会 2015年8月30日~9月2日、帯広畜産大学(帯広市)

麻田 正仁ら、WR99210 選択システム及びプラスチジン S 選択システムの併用による *Babesia bovis* 遺伝子改変技術の確立及びノックアウト遺伝子相補実験への応用、第84回日本寄生虫学会大会、2015年3月21日~3月22日、杏林大学(三鷹市)

麻田 正仁ら、*Babesia bovis* におけるダブルトランスフェクション法の確立、第157回日本獣医学会学術集会、2014年9月9日~9月12日、北海道大学(札幌市)

麻田 正仁ら、バベシア原虫における遺伝子改変技術の開発、第12回分子寄生虫学マラリア研究フォーラム合同大会、2014年8月31日~9月3日、帯広畜産大学(帯広市)

Masahito Asada ら、Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites, 13th International Congress of Parasitology (ICOPA), 2014年8月10日~8月15日、Camino Real Hotel、(メキシコ・メキシコシティー)

麻田 正仁ら、バベシア原虫におけるダブルトランスフェクション法の確立、第83回日本寄生虫学会大会、2014年3月27日~3月28日、愛媛大学城北キャンパス(松山市)

Masahito Asada、Shin-ichiro Kawazu、Study on gliding motility of *Babesia bovis* merozoites using bioimaging analysis、第6回 ASEAN 熱帯医学寄生虫学会議、2014年3

月5日~3月7日、Intercontinental Kuala Lumpur (マレーシア・クアラルンプール)

Masahito Asada ら、Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy、第3回感染症若手フォーラム、2014年2月13日~2月15日、やすらぎ伊王島・海の見えるホテル(長崎市)

麻田 正仁ら、*Babesia bovis* チオレドキシネルオキシターゼ BbTPx-1 ノックアウト原虫の活性窒素種負荷に対する感受性上昇 第11回分子寄生虫学マラリア研究フォーラム、2013年10月2日~10月3日、長崎大学(長崎市)

麻田 正仁ら、*Babesia bovis* チオレドキシネルオキシターゼ BbTPx-1 ノックアウト原虫は活性窒素種負荷に対する感受性が上昇する、第156回日本獣医学会学術集会、2013年09月20日~09月22日、岐阜大学(岐阜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
無し

〔その他〕
賞

麻田 正仁、日本寄生虫学会 第24回奨励賞(2015年3月) (業績名:「バイオイメージングによる *Babesia bovis* メロゾイト滑走運動の研究」)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麻田 正仁 (ASADA, Masahito)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 40587028

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

矢幡 一英 (YAHATA, Kazuhide)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
ハキミ ハッサン (HAKIMI, Hassan)
長崎大学・熱帯医学研究所・特任研究員
横山 直明 (YOKOYAMA, Naoaki)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
五十嵐 郁男 (IGARASHI, Ikuo)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
金子 修 (KANEKO, Osamu)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
Carlos E Suarez (SUAREZ, E. Carlos)

ワシントン州立大学・獣医学部・准教授
河津 信一郎 (KAWAZU, Shin-ichiro)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授