

令和 3 年 4 月 24 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05966

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによるBabesia gibsoniの薬剤耐性獲得機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of mechanisms of drug resistance of Babesia gibsoni using the next generation sequencer.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：犬バベシア症の病原体であるBabesia gibsoniの薬剤耐性獲得機序を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いてその遺伝子発現量を網羅的に解析を実施した。その結果、7,382個の遺伝子断片について発現量の比較が可能であり、うちB. gibsoni由来の遺伝子で4つ発現量が増加しているものが見つかった。これらの遺伝子のうち2つについて全長をクローニングし、シーケンスを実施した結果、薬剤耐性獲得に関与していることが疑われる遺伝子を2つ(トレハロース-6-リン酸合成酵素およびゴルジ複合体のタンパク質)検出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

犬バベシア症は西日本で多発する感染症であるが、重症の場合犬が斃死する。この原因の一つとして、薬剤耐性原虫が出現し、治療薬が効かなくなることが指摘されている。このため、より効率よく確実に犬バベシア症を治療するには薬剤耐性原虫のメカニズムを明らかにし、これを解決する治療方法を確立する必要がある。今回、このメカニズムを明らかにするために先端技術である次世代シーケンサーを用いて解析を行なった。その結果、いくつか薬剤耐性獲得に関与することが強く疑われる遺伝子の検出に成功し、新しい治療法の開発に向けて前進することができた。今後はこの遺伝子の機能などを解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：The mechanism for the drug resistance in Babesia gibsoni, which is one cause for the canine babesiosis, was analyzed with next generation sequencer. The transcription of genes in Babesia gibsoni was analyzed using RNAseq to compare the transcription of genes compared with the drug sensitive isolate. As a result, the 7,382 sequences were analyzed by RNAseq. Within these sequences, the amount of 4 sequences from drug resistant B. gibsoni were increased compared with drug sensitive B. gibsoni. Two sequences were cloning and sequencing. One sequence was suspected as a gene for conserved oligomeric Golgi complex. Other was suspected as a gene for trehalose-6-phosphate synthase. It was considered that those genes would relate with the drug resistance.

研究分野：寄生虫病学

キーワード：Babesia gibsoni 薬剤耐性 次世代シーケンサー 犬バベシア症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

犬バベシア症はマダニ媒介性の感染症であり、本邦では主な原因原虫は *Babesia gibsoni* で、西日本を中心にその発生が報告されている。主な症状は発熱、溶血性貧血および血小板減少症であり、重篤な場合や子犬が罹患した場合には死に至ることがある。本疾患の治療には主に抗原虫薬が使用され、古典的にはジミナゼン製剤 (diminazene aceturate, DA) が利用されてきている。しかしながら、DA は作用機序が不明な上、体内のバベシア原虫を完全には排除することができず再発を起こすリスクが高く、繰り返し使用することで DA 耐性株が生じ効果が低くなることが指摘されている。この点に関して申請者らは、*in vitro* にて *B. gibsoni* の DA 耐性株を作成し (Hwang et al., 2010) DA 耐性株の増殖力は弱いにもかかわらずエネルギー消費量が増加していること、クリンダマイシンなど他の薬剤への抵抗力が増していること、ミトコンドリア DNA に変異は認められないこと、などの特徴を明らかにしてきたが、薬剤耐性獲得機序の本質は明らかにできていない。以上のことから、DA 耐性獲得機序の解明にはマイクロアレイや次世代シーケンサーなどの網羅的な検索手法が有効ではないかと考え、研究を進めてきている。一方で、2003 年頃よりアトバコン (atovaquone, ATV) の *B. gibsoni* に対する効果が報告されるようになり、現在では有効な治療法の一つとして認識されている。ATV は効果が早く、速やかに末梢血中の原虫を減少させるが、本薬剤においても薬剤耐性株の出現が指摘されている (Iguchi et al., 2012)。ATV はヒトのマラリア症の治療薬として用いられており、ATV 耐性株が生じることが明らかになっている。マラリア原虫において ATV の標的はミトコンドリアであり、ミトコンドリアに変化が生じることで耐性を獲得するとされている。同様に、*B. gibsoni* においても ATV 耐性株ではミトコンドリア DNA のうちシトクローム b の遺伝子において 363 番目のグアニンがチミンに置換されることにより、アミノ酸配列のうち 121 番目のメチオニンがイソロイシンに変化すること (M121I) が報告されている。非常に興味深いことに、ATV 耐性株はわずか 6 日の暴露により生じ、また ATV に暴露されたことのない *B. gibsoni* においても M121I の形質を保有した株が存在することも報告されており、ATV 耐性株においては ATV 暴露によりもともと耐性をもつ株が選択されていることが疑われる。以上のことから、犬バベシア症の代表的な治療薬である DA と ATV においてそれぞれの薬剤耐性株が存在し、その薬剤耐性獲得機序は大きく異なることが予想される (図 1)。このことはバベシア原虫が様々な機序により薬剤耐性を獲得することを示唆しており非常に興味深く、「*B. gibsoni* がどのように薬剤耐性を獲得しているか」を明らかにすることは犬バベシア症の制圧のために重要な課題であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では *B. gibsoni* の DA 耐性株ならびに ATV 耐性株を解析・比較し各々の薬剤耐性獲得機序を明らかにするとともに、それらの情報を基に犬バベシア症の新しい治療法・治療プロトコルを作成することを目的とする。例えば ATV では単剤で使用すると薬剤耐性株を生じやすいことから多剤併用が研究されており、エビデンスに基づいて効率的に新規治療法を開発するには ATV 耐性獲得機序について明らかにする必要がある。このように、DA 耐性株および ATV 耐性株を解析・比較することでそれぞれの耐性獲得機序が明らかになれば、その成果に基づいた新しい治療法・治療プロトコルの発明が可能になると思われる。本研究では、ほとんどが未解析のゲノム解析ならびに遺伝子発現量の解析を次世代シーケンサーを利用して行う。

### 3. 研究の方法

本研究では、*B. gibsoni* の DA 耐性および ATV 耐性獲得機序を明らかにするために、*in vitro* にて培養している *B. gibsoni* の野生株、DA 耐性株および ATV 耐性株を用いて、次世代シーケンサーによる以下の解析を行う (図 2)。

*B. gibsoni* の全ゲノムの株間での比較：各株よりゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによりゲノム解析を行い、変異の存在する遺伝子を検索する。

*B. gibsoni* の各株における遺伝子発現量の比較：各株より RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現量の変化を観察する。

上記 および の解析により、変異の見つかった遺伝子、あるいは発現量の変化の見られた遺伝子に関して、個別にクローニング、塩基配列の解析、および遺伝子発現量の比較を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) DA 耐性 *B. gibsoni* の熱ショックタンパク質発現量解析

次世代シーケンサーによる解析を行うときに、薬剤耐性株を確認するための特徴を把握するために、DA 耐性株について熱ショックタンパク質 (HSP) 90 および HSP70 の発現量を解析した。その結果、HSP90 (図 1) および HSP70 (図 2) とともに、DA 耐性株において遺伝子転写量、タ

ンパク質発現量が低下しており、これが DA 耐性株の特徴であることが明らかになった（参考文献 1）。この HSP90 および HSP70 は分子シャペロンであるが機能を発揮するにあたりエネルギーを消費することが明らかになっている。これらのタンパク質量が減少していることは DA 耐性株において報告しているエネルギー消費量の減少と関連すると思われる。また、HSP90 と HSP70 は *B. gibsoni* の増殖に参与していると考えられることから、これらの減少は DA 耐性株の増殖が野生株に比べて弱いことにも関連していると思われる。

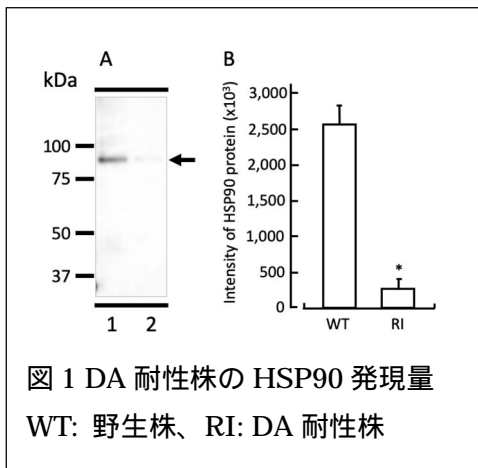


図 1 DA 耐性株の HSP90 発現量  
WT: 野生株、RI: DA 耐性株

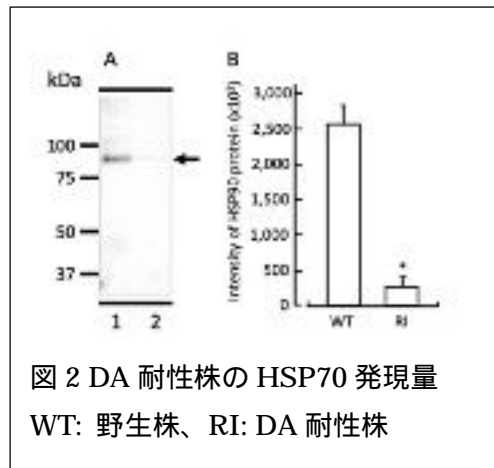
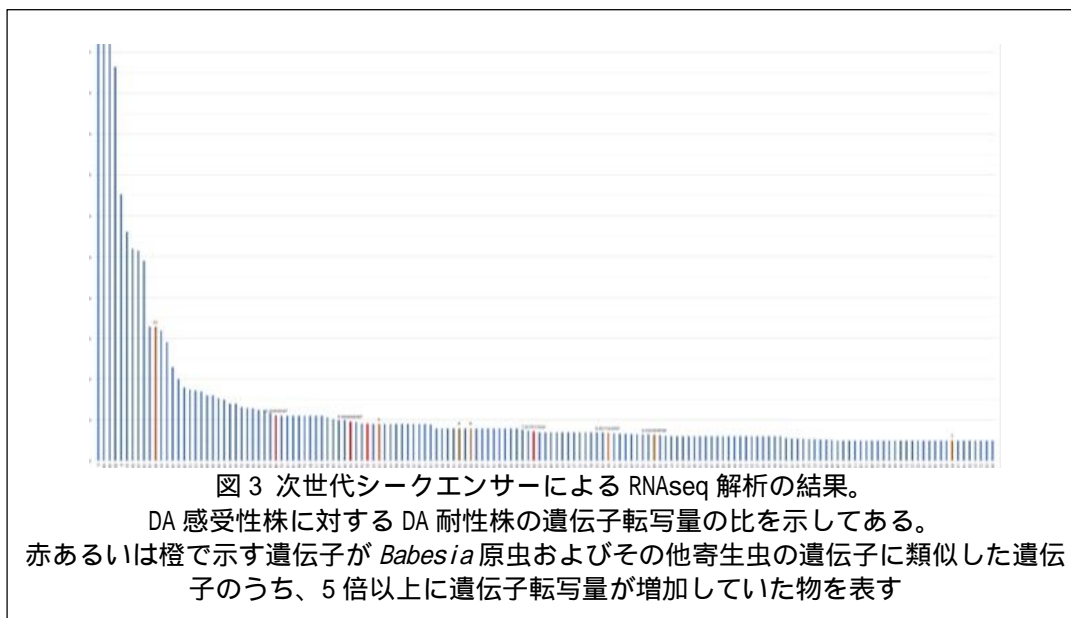


図 2 DA 耐性株の HSP70 発現量  
WT: 野生株、RI: DA 耐性株

## (2) DA 耐性株の RNAseq 解析

培養維持している DA 耐性株ならびに DA 感受性株を用いて次世代シーケンサーを用いた RNAseq 解析を実施した。DA 感受性株は、培養にて維持している *B. gibsoni* を用いて、限界希釈法を利用して分離した。これらの培養原虫から RNA を抽出し、次世代シーケンスによる解析、比較を実施したところ、7,382 個の RNA 断片について比較が可能であった（図 3）。ただし、解析



された遺伝子には犬白血球由来のものが含まれており、これをなるべく防ぐことが今後の課題と思われる。犬由来の遺伝子を除外し、DA 耐性株において DA 感受性株よりも転写量が増えていると思われる遺伝子を選抜し、DA 耐性獲得に関与することが疑われる候補遺伝子を複数ピックアップした。これらの遺伝子を BLAST サーチにより検索したところ、2 つについてそれぞれ Conserved oligomeric Golgi complex ならびに trehalose-6-phosphate synthase に類似の配列であった。このことからこの 2 つの遺伝子をクローニングし、全長をシーケンスで確認したので、リアルタイム PCR により遺伝子転写量を測定したところ、RNAseq の結果と一致したので、これらの遺伝子は DA 耐性株において遺伝子転写量が増加していることが明らかになった。また、茂木氏が別途実施した RNAseq 解析でも複数の候補遺伝子が検出され、その中に Trehalose synthase が含まれていた。これらのことから DA 耐性獲得において trehalose が大きく関与していることを疑っている。trehalose は昆虫や真菌の細胞内に存在し、それらのストレス応答や、乾燥などから生き延びるために利用されているとされており、*B. gibsoni* においてもストレス環境下での生存や薬剤耐性獲得に貢献していると考えられる。

## 参考文献

1. Yamasaki, M., Idaka, N., Abe, M. and Takiguchi, M. (2020) Reduced expression

levels of heat shock protein 90 in a diminazene aceturate-resistant *Babesia gibsoni* isolate. Exp. Parasitol. 221: 108050. DOI: 10.1016/j.exppara.2020.108050

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 MASUDA Misa, OTSUKA-YAMASAKI Yayoi, SHIRANAGA Nobuyuki, IGUCHI Aiko, UCHIDA Naohiro, SATO Reeko, YAMASAKI Masahiro	4. 巻 81
2. 論文標題 Retrospective study on intercurrent pancreatitis with <i>Babesia gibsoni</i> infection in dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1558 ~ 1563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.19-0280	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 Yamasaki Masahiro, Idaka Natsuki, Abe Moeko, Takiguchi Mitsuyoshi	4. 巻 221
2. 論文標題 Reduced expression levels of heat shock protein 90 in a diminazene aceturate-resistant <i>Babesia gibsoni</i> isolate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Parasitology	6. 最初と最後の頁 108050 ~ 108050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exppara.2020.108050	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松田菜美、佐藤良、内田直宏、佐藤れえ子、小林沙織、山崎真大
2. 発表標題 次世代シークエンサーを用いたジミナゼン感受性および耐性 <i>Babesia gibsoni</i> 株の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamasaki M., Katayama, M., Mitsui I., Satoh H., Yamamoto Y.
2. 発表標題 A case of renal interstitial cell tumor with polycythemia in a Yorkshire terrier
3. 学会等名 Asia Meeting of Animal Medicine Specialists 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤良、井口愛子、松田菜美、内田直宏、森田智也、小林沙織、佐藤れえ子、山崎真大
2. 発表標題 Babesia gibsoniにおける蛍光色素を用いた薬剤感受性試験
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村真優、内田直宏、森田智也、落合謙爾、東智志、三井一鬼、山崎真大
2. 発表標題 全身多臓器に血管病変が多発し急速な病態進行を呈した青色ゴムまり様母斑症候群様疾患を疑う犬の一例
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎弥生、稲波修、篠春香、佐藤れえ子、山崎真大
2. 発表標題 ポメラニアン犬で見つかったNADHメトヘモグロビン還元酵素欠損症原因タンパク質I194L-b5Rの解析
3. 学会等名 第16回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 益田美佐、井口愛子、内田直宏、小林沙織、佐藤れえ子、山崎真大
2. 発表標題 Babesia gibsoniに対するニューキノロン系抗菌薬の有効性の評価
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
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
研究分担者	内田 直宏 (Uchida Naohiro)  (00784315)	岩手大学・農学部・助教  (11201)	
研究分担者	井口 愛子 (Iguchi Aiko)  (90777020)	鳥取大学・農学部・講師  (15101)	
研究分担者	茂木 朋貴 (Motegi Tomoki)  (40803416)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任研究員  (12601)	

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
---------	---------