

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19258

研究課題名(和文) サイトカイン発現住血原虫の開発研究

研究課題名(英文) Studies on development of the Babesia parasites that express cytokine for non-specific immune activation

研究代表者

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

研究者番号：60312295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシに不顕性感染する赤血球寄生性のバベシア原虫にインターフェロン等のサイトカインを発現させ、ウイルス・細菌・寄生虫といった病原体の種類に応じて、宿主動物の免疫系を抗原非特異的に自在に制御して、これら病原体による慢性消耗性感染症による被害を軽減する技術を開発することを目的とする。サイトカインを発現するバベシア原虫を作製する基盤技術を開発する目的で、原虫ゲノムをCRISPR/Cas9系で編集する実験系及びGlcN誘導性gImS リボザイムを応用したノックダウンの実験系を外国産のバベシア原虫(*Babesia bovis*:バベシア ポービス)で確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集(CRISPR/Cas9系)の技術ならびに、サイトカイン遺伝子など、原虫ゲノムに導入した遺伝子の発現を事後随意に調節するGlcN誘導性gImS リボザイムノックダウン技術を応用することで、バベシア原虫でのゲノム機能解析やサイトカイン発現原虫などのGenetically Attenuated Parasite(GAP)開発研究が、更に進展することが期待できる。現在、これら実験系の国産のバベシア原虫(*Babesia ovata*:バベシア オバタ)への応用を試みている。

研究成果の概要(英文)：The object of this study was to express cytokines such as interferon in haemoprotozoan Babesia parasite that causes asymptomatic infection in cattle. The parasite which expresses cytokine can modify immunity of the host animal accordingly regardless the types of pathogens such as viruses, bacteria, and parasites to reduce the damage caused by chronic debilitating infections caused by these pathogens. In order to develop a basic technology to produce Babesia parasite which expresses cytokines, an experimental system for editing the parasite genome with the CRISPR / Cas9 system and a knockdown experimental system applying the glucosamine (GlcN)-induced gImS ribozyme were established in non-domestic parasite species Babesia bovis.

研究分野：分子寄生虫病

キーワード：獣医学 疾病予防 制御 バベシア 遺伝子改変原虫 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

【解決すべき問題】重要放牧病である慢性消耗性感染症の対策では、ワクチンや特効薬の開発が途上にあるため、共同牧場での煩雑かつ非効率的な衛生管理が必要になり、乳肉生産におけるコストの削減を目的とした放牧事業が本来の目的を達成できていない。【解決へのヒント】宿主の免疫系を、投薬や飼料を介することなく、ウイルス・細菌・寄生虫等の病原体毎に自在に制御することでできれば、これら感染症による被害とその対策コストを一括して画期的に軽減することができる。実際、インターフェロンによるウシウイルス病の予防・治療が試みられている。【研究シーズ】国産の住血 (*Babesia ovata*: バベシア オバタ) はウシに不顕性感染を引き起す。我々は、*B. ovata* の全ゲノムを解読し、この原虫で外来遺伝子を発現する、また任意の遺伝子を欠損させる技術を開発した。バベシア原虫では、微生物学的にクリーンな試験管内培養の技術も確立している。【問題解決への提案】そこで、*B. ovata* の生物学的特性と、この原虫で我々が独自に開発した遺伝子改変技術を組み合わせて、インターフェロンなどのサイトカインを発現する遺伝子組換え原虫を作製すれば、病原体の種類に応じて宿主の免疫系を抗原非特異的に自在に制御する「サイトカイン発現住血原虫」が開発できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

【研究の背景】ウシ放牧病のうち、ヨーネ病、ウシ白血病、ウシウイルス性下痢・粘膜病、ピロプラズマ病等の重要感染症に対する現行の防疫対策には限界があり、特効薬もないことから経済的被害が大きく、アフリカ大陸の原虫病のみでも、年間 200 億円を越える被害が試算されている。一方、これら慢性消耗性感染症では依然として効果的なワクチンの実用化にも至っていないのが現状で、この問題を克服する革新的なアイデアと技術が求められている。【研究の目的】そこで本研究では、この問題を解決するため、ウシに不顕性感染する赤血球寄生性の住血原虫を利用する。即ち、この原虫細胞にインターフェロン等のサイトカインを分泌性あるいは細胞表面性のタンパク質として発現させ、ウイルス・細菌・寄生虫等の病原体の種類に応じて宿主動物の免疫系を抗原非特異的に自在に制御することで、これら慢性消耗性感染症による損耗を軽減する技術を開発する。実際、インターフェロンによるウシウイルス病の予防・治療が試みられている。研究の対象とする国産の住血原虫 (*Babesia ovata*: バベシア オバタ) は、この送達系のプラットフォームとして理想的である。この原虫は、ウシで不顕性感染を引き起こし、また動物に持続的に感染することで、安全かつ安定した宿主免疫系の制御が期待できる。

3. 研究の方法

(1) バベシア原虫ゲノムを Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) / CRISPR-Associated Proteins 9 (Cas9) 系で編集する実験系の確立：
サイトカイン発現バベシア原虫を効率よく作製するための、外国産原虫 (*Babesia bovis*: バベシア ボービス) のゲノムを CRISPR/Cas9 系で編集する実験系を確立した。Cas9 及び human dihydrofolate reductase (hDHFR: 抗原虫薬剤 WR99210 に対する耐性マーカー) 遺伝子を *elongation factor-1a* bidirectional promoter 下流で同時に発現し、また、Single guide RNA (sgRNA) をバベシア ボービス *U6 spliceosomal RNA promoter* 下流で発現するプラスミド (BbU6-Cas9-hDHFR-sbp3-myc) を構築した (図 1)。このプラスミドコンストラクトを用いて、①バベシア ボービス Spherical body protein 3 (SBP3) C 末端へのタグの付加、②Thioredoxin peroxidase 1 遺伝子 (*tpx-1*) への変異導入、及び③*tpx-1* オープンリーディングフレーム (orf) の外来タンパク質遺伝子 orf との置換、を行った。試験管内 (*in vitro*) 培養した赤血球内寄生期のバベシア ボービス原虫細胞(メロゾイト)に、Human T Cell Nucleofector™ Kit を用いて、電気穿孔法 (Nucleofector device: program v-024; Amaxa Biosystems, Cologne, Germany) で、各実験用に構築したプラスミドを導入した。プラスミドの導入後、バベシア ボービスメロゾイトを WR99210 (10 nM) 添加培地で培養して、sgRNA/Cas9 複合体のプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 近傍の標的配列への結合と DNA 二本鎖切断 (DSB)、それに引き続いて起こる、DNA 修復用鋳型 (BbU6-Cas9-hDHFR-sbp3-myc に挿入) による相同組み換え型修復 (HRD) を誘導した。

(2) バベシア原虫で遺伝子の発現をノックダウンする実験系の確立：
サイトカイン発現バベシア原虫において、CRISPR/Cas9 系で導入したサイトカイン遺伝子の発現を事後随意に調節するため、遺伝子発現ノックダウンの実験系を確立した。グルコサミン (GlcN) 誘導性 glmS リボザイム配列を、(1) の CRISPR/Cas9 系を応用して、バベシア ボービス原虫ゲノム上の目的遺伝子の下流に挿入する実験系を確立した。glmS リボザイムによるノックダウン実験系 (Prommana *et al.*, PLoS One 2013) では GlcN の培地添加によって、目的とする遺伝子の発現を減弱することができる。この実験系を応用して、Spherical body に局在する新規タンパク質 variant erythrocyte surface antigen (VESA) export-associated protein

(VEAP) のノックダウンができるバベシア ボービス原虫を作製した。VEAP が原虫感染赤血球の血管内皮細胞への接着 (脳性バベシア症の病態形成) に関与することを検証する目的で、VEAP をノックダウンしたバベシア ボービス原虫のウシ脳血管内皮細胞 (bovine brain endothelial cells) への接着を野生型原虫のそれと比較して観察した。

4. 研究成果

(1) バベシア原虫ゲノムを CRISPR/Cas9 系で編集する実験系の確立:

① SBP3 c 末端へのタグの付加

BbU6-Cas9-hDHFR-sbp3-myc (図 1 A 左側パネル) 導入原虫を WR99210 (10nM) 添加培地で培養したところ、培養 10 日目に原虫感染赤血球 (iRBC) の出現を確認でき、iRBC の比率は上昇した。その後限界希釈法によるクローニングを行い、プラスミド導入 (tg) 原虫のクローンを複数株確立した。クローン 2 株 (tg1 及び tg2) について Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) で sgRNA の発現を検証したところ、標的とした 100 base pair (bp) のフラグメントが増幅され、U6 spliceosomal RNA 5'配列のプロモーター活性が確認できた (図 1 A 右側パネル)。また、間接蛍光抗体法 (IFAT) で Cas9 の発現を検証したところ、tg 原虫の核内に緑色の特異蛍光が確認され、Cas9 の発現が確認できた (図 1 B)。sbp3 3'への myc タグ遺伝子 (2myc) の挿入 (図 2 A 左側パネル) を PCR で検証したところ、標的とした 1.1 kilo base pair (Kb) のフラグメントが増幅され、正しい挿入を確認できた (図 2 A 右側パネル)。IFAT で SBP3-myc の発現を検証したところ、SBP3 が局在する原虫細胞アピカルエンドと iRBC の表面に緑色の特異蛍光が確認され、myc タグを付加した SBP3 の発現が確認できた (図 2 B)。

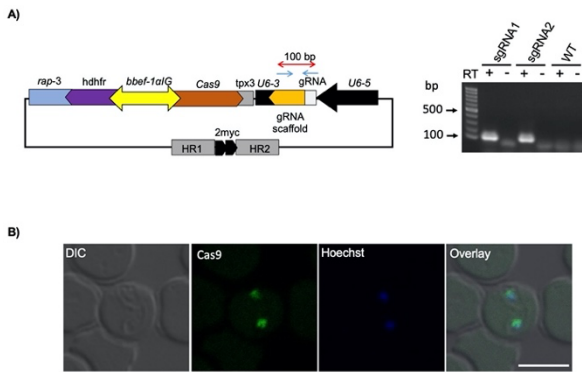


図 1 : Cas9 及び sgRNA の発現

(A 左側パネル) プラスミドの構築: *rap-3*, rhoptry associated protein 3'配列; *hdhfr* orf, human dihydrofolate reductase オープンリーディングフレーム (orf)配列; *ef-1aIG*, elongation factor-1a bidirectional promoter 配列; *tpx-3*, thioredoxine peroxidase-1 3'配列; *U6-3*, *U6 spliceosomal RNA* 3'配列; *gRNA*, guide RNA; *U6-5*, *U6 spliceosomal RNA* 5'配列; HR, homologous region (*sbp3* 相同配列: DNA 修復用鋳型); 2myc, myc タグ タンデム配列 (A 右側パネル) BbU6-

Cas9-hDHFR-sbp3-myc 導入原虫での sgRNA の発現: sgRNA1, クローン tg1; sgRNA2, クローン tg2; RT+, reverse-transcription (+); RT-, reverse-transcription (-); WT, wild type (B) BbU6-Cas9-hDHFR-sbp3-myc 導入原虫での Cas9 の発現: DIC, 微分干渉イメージ; Cas9, FLAG-tagged Cas9 を抗 FLAG 抗体で検出したイメージ (緑色); Hoechst, Hoechst 33342 による核染色イメージ (青色); Overlay, DIC/Cas9/ Hoechst の重層イメージ; Scale-bar = 5 µm

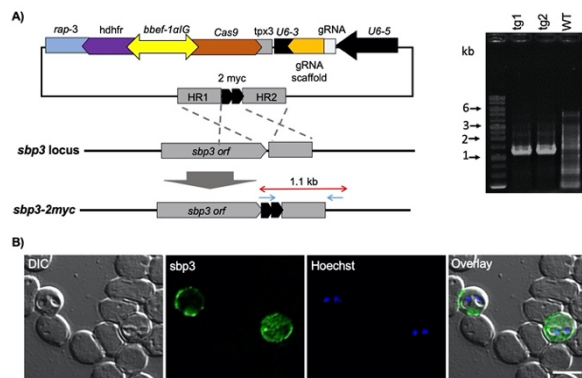


図 2 : CRISPR/Cas9 による SBP3 c 末端への myc タグの付加

(A 左側パネル) プラスミドの構築: (図 1 A 左側パネルの説明を参照); *sbp3* orf, spherical body protein 3 オープンリーディングフレーム配列 (A 右側パネル) *sbp3* 3'への myc 挿入の確認: tg1, クローン tg1; tg2, クローン tg2; WT, wild type (B) myc タグを付加した SBP3 の発現: DIC, 微分干渉イメージ; sbp3, myc-tagged Cas9 を抗 myc 抗体で検出したイメージ (緑色); Hoechst, Hoechst 33342 による核染色イメ

ージ (青色); Overlay, DIC/Cas9/ Hoechst の重層イメージ; Scale-bar = 5 µm

② tpx-1 への変異導入

TPx-1 はペルオキシダーゼ活性を有する偏在性の抗酸化タンパク質で、他の生物種では、そのペルオキシダーゼ活性には、N 末端側の活性基 (FVCP) の Cys47 が重要と報告されている。そこで、バベシア ボービス TPx-1 においても活性基 Cys47 の重要性を検証する目的で、CRISPR/Cas9 実験系を用いて *tpx-1* へ変異を導入して、Cys47 を Ser47 に置換した。BbU6-Cas9-hDHFR-*tpx-1*-mutant プラスミド (図 3 A) を用いて Cys47 (TGC) ならびに近傍の PAM (CGG) への点変異の導入を試み、*tpx-1* locus の塩基配列を、DNA シーケンスで検証したところ、目的とする変異の導入 (TGC→TCC/CGG→CAG) が確認できた (図 3 B)。

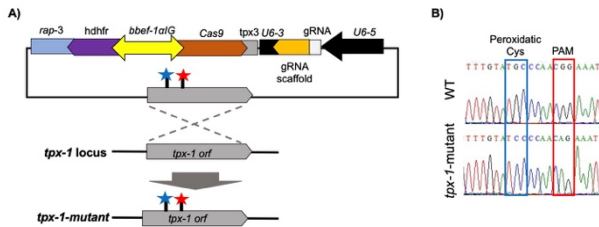


図3：CRISPR/Cas9による *tpx-1* への変異導入

(A) プラスミドの構築: (図1 A 左側パネルの説明を参照) ; *tpx-1* orf, Thioredoxin peroxidase オープンリーディングフレーム配列; 星印, 変異導入部位 (Bを参照)

(B) *tpx-1* locus の塩基配列: *tpx-1-mutant*, 変異導入クローン; WT, wild type

③ *tpx-1* と *egfp* の置換

私たちはこれまでに、相同組換えによる従来の逆遺伝の手法を用いて作製した *tpx-1* 欠損したバベシア ボービスでは、赤血球寄生期 (メロゾイト) の活性窒素種 (RNS) に対する感受性が亢進することを報告している (Asada *et al.*, PLoS One 2015)。そこで、この既往の成果を、別の手法を用いて作製した遺伝子欠損原虫でも検証する目的で、CRISPR/Cas9 実験系を用いて *tpx-1* を *egfp* に置換した。BbU6-Cas9-hDHFR-*tpx-1*-KO-GFP プラスミド (図4 A 左側パネル) を用いて *tpx-1* locus の *egfp* orf への置換を試みた。*tpx-1* と *egfp* の置換を PCR で検証したところ、*egfp* を標的とした 1.2 kilo base pair (Kb) のフラグメントが増幅され (1 及び 2)、一方、*tpx-1* を標的とした 1.6 Kb のフラグメントが増幅されなかったことから (3)、*tpx-1* の欠損と *egfp* の導入を確認できた (図4 A 右側パネル)。蛍光顕微鏡で eGFP の発現を検証したところ、原虫細胞の細胞質に緑色の蛍光が確認され、eGFP の発現が確認できた (図4 B)。

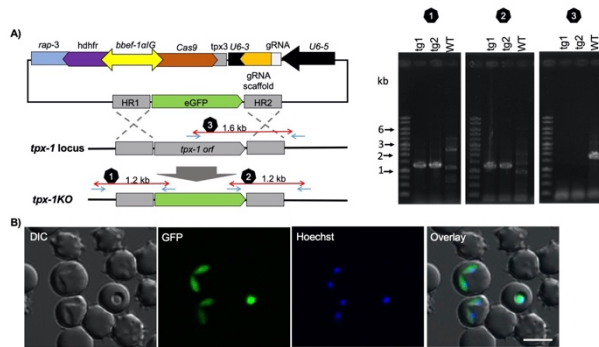


図4：CRISPR/Cas9による *tpx-1* と *egfp* の置換

(A 左側パネル) プラスミドの構築: (図1 A 左側パネルの説明を参照) ; *tpx-1* orf, Thioredoxin peroxidase オープンリーディングフレーム配列; *eGFP*, eGFP orf

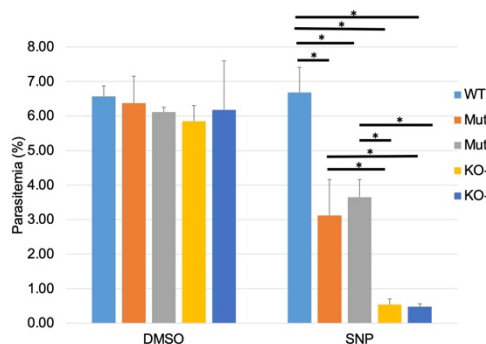
(A 右側パネル) *tpx-1* と *egfp* の置換の確認: tg1, クローン tg1; tg2, クローン tg2; WT, wild type (B) eGFP の発現: DIC, 微分干渉イメージ; GFP, 蛍光顕微鏡イメージ (緑色); Hoechst, Hoechst 33342 に

よる核染色イメージ (青色); Overlay, DIC/Cas9/ Hoechst の重層イメージ; Scale-bar = 5 μ m

④ ゲノム改変原虫の表現型観察

CRISPR/Cas9 実験系で作製した②TPx-1 変異体 (Cys47→Ser47) 発現原虫クローン及び③TPx-1 欠損原虫クローン メロゾイトの RNS 感受性を検証した。

TPx-1 変異体発現原虫 (mutant) 及び TPx-1 欠損原虫 (KO) のクローンそれぞれ 2 株を、sodium nitroprusside (SNP) を最終濃度 10 μ M になるように添加した培養液を用いて *in vitro* 培養した。寄生率 (iRBC/RBC: Parasitemia) 0.1% から培養を開始して、4 日後の寄生率を、野生型 (WT) のそれと比較した。SNP は細胞内に取り込まれると NO を産生することで RNS を派生する。溶媒対象 (DMSO) を添加した培養液では、mutant クローン、KO クローンならびに WT と同様に、4 日間の培養で寄生率が約 6% まで上昇した。一方、SNP を添加した培養液では、KO クローンの培養 4 日後の寄生率は 1% 以下で、また mutant クローンの寄生率も約 3% に留まった。WT は SNP 添加培養液でも、DMSO 添加培養液での培養と同じく、4 日間の培養で寄生率が 6% 以上に上昇した。以上から、相同組換えによる従来の逆遺伝の手法を用いて作製した



(*Plasmodium falciparum*) の TPx-1 ではペルオキシニトライト (ONOO \cdot) を還元する酵素活性が報告されている。

図5：CRISPR/Cas9によるゲノム改変原虫の RNS 感受性

TPx-1 欠損 (KO) 原虫で観察された RNS に対する感受性の亢進が、CRISPR/Cas9 実験系で作製した TPx-1 KO 原虫でも検証できた。一方、活性基 Cys47 を Ser47 に置換した TPx-1 変異体発現原虫 (mutant) では、SNP 添加培養液での 4 日間培養後の寄生率が約 3% と、溶媒対象でのそれ (約 6%) の半分程度まで上昇した。このことから、バベシア ボービス TPx-1 には Cys47 以外のペルオキシダーゼ活性基が存在する可能性、あるいは、ペルオキシダーゼ活性以外の酵素活性が存在する可能性が示唆された。類似の熱帯熱マラリア原虫

Mutant-clone, TPx-1 変異体 (Cys47→Ser47) 発現原虫クローン; KO-Clone, TPx-1 欠損原虫クローン; WT, wild type; DMSO, Dimethyl sulfoxide (溶媒対象) 添加培地での培養成績; SNP, Sodium nitroprusside (10 μ M) 添加培地での培養成績; Parasitemia, 培養 4 日目の寄生率 (iRBC/RBC) %, mean (triplicate culture) + standard deviations (SD); *, $P < 0.0001$ [one-way ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison test]

(2) バベシア原虫で遺伝子の発現をノックダウンする実験系の確立:

グルコサミン (GlcN) 誘導性 *glmS* リボザイム配列 (図 6 A) を、CRISPR/Cas9 系を応用して VEAP 遺伝子の下流に挿入したバベシア ボービス原虫を作製した。VEAP は、バベシア ボービスの Spherical body に局在する機能未知の新規タンパク質であった。BbVEAP-myc-*glmS* プラスミド (図 6 B) を用いて作製した VEAP ノックダウン (KD) 原虫の培養液に GlcN (5mM) を添加して、myc タグ、VEAP の発現をウェスタンブロット法で検証したところ、VEAP 特異的な KD が確認できた (図 1 B)。VEAP KD 原虫 iRBC のウシ脳血管内皮細胞 (bovine brain endothelial cells; BBECs) への接着を野生型原虫 (WT) のそれと比較して観察したところ (図 7 A)、GlcN の存在下において、VEAP KD 原虫の BBECs への接着が著しく減少した (図 7 B)。一方、WT の BBECs への接着は、GlcN の存在下においても影響を受けなかった (図 7 B)。このことから、バベシア ボービスの Spherical body に局在する新規タンパク質 VEAP が原虫感染赤血球の血管内皮細胞への接着 (脳性バベシア症の病態形成) に関与することが示唆された。

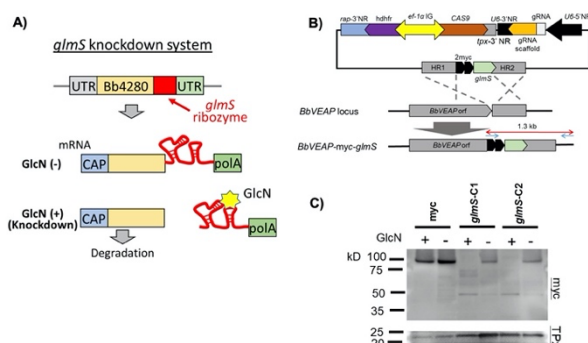


図 6: バベシア原虫での VEAP ノックダウン (KD)

(A) *glmS* リボザイム ノックダウン実験系の概要: UTR, 非翻訳領域; Bb4280, VEAP orf; *glmS* ribozyme, *glmS* リボザイム配列; CAP, mRNA 5' キャップ; polyA, mRNA 3' polyA tail; GlcN, グルコサミン

(B) BbVEAP-myc-*glmS* プラスミドの構築: (図 1 A 左側パネルの説明を参照)

(C) BbVEAP KD: GlcN, グルコサミン; myc, BbVEAP-myc プラスミド (B の構築

から *glmS* 配列を取り除いたプラスミド) で BbVEAP ローカスを修飾して myc タグを付加した BbVEAP を発現するバベシア原虫クローン (遺伝子導入対照) での抗 myc タグ抗体との反応; *glmS*-C1, クローン *glmS*-C1 の抗 myc タグ抗体との反応; *glmS*-C2, クローン *glmS*-C2 の抗 myc タグ抗体との反応; TPx-1, 抗 TPx-1 抗体との反応 (ローディング対照); kD, kilo dalton

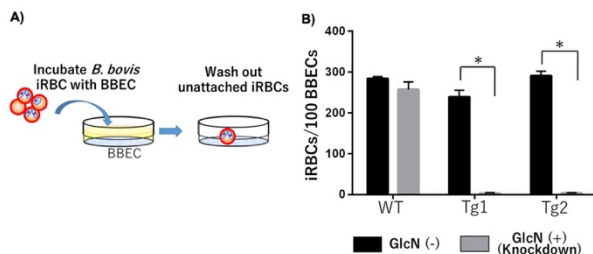


図 7: VEAP KD バベシア原虫感染赤血球 (iRBC) のウシ脳血管内皮細胞 (BBECs) への接着

(A) iRBC/BBECs 接着試験の方法 (概要)
(B) iRBC/BBECs 接着試験の成績: iRBCs/100 BBECs, BBEC100 細胞に接着した iRBC の数 (個) mean (triplicate assay) + standard error of the mean (SEM); GlcN

(-), グルコサミン非添加; GlcN (+), グルコサミン添加 (KD); Tg1, クローン Tg1; Tg2, クローン Tg2; WT, wild type; *, $P < 0.0001$ [paired Student's t test]

(3) サイトカイン発現住血原虫開発の方向性と今後の取り組み:

外国産のバベシア原虫 (*Babesia bovis*: バベシア ボービス) での遺伝子改変原虫の作製にゲノム編集 (CRISPR/Cas9 系) の技術を応用することに成功した。この技術を応用することで、バベシア原虫でのゲノム機能解析やサイトカイン発現原虫などの Genetically Attenuated Parasite (GAP) 開発研究が、更に進展することが期待できる。

バベシア原虫において遺伝子の発現を調節する目的で、GlcN 誘導性 *glmS* リボザイムを CRISPR/Cas9 実験系でゲノムに導入して作動することにも成功した。また、導入した遺伝子を事後に取り除く目的で、Dimerizable Cre リコンビナーゼ (DiCre) /loxP システムの応用にも着手している。これらの実験系の整備によって、サイトカイン発現バベシア原虫に CRISPR/Cas9 系で導入したサイトカイン遺伝子を、事後随意に発現調節あるいは取り除くことができる。

一方、サイトカイン発現住血原虫開発のプラットフォームとする国産のバベシア原虫 (*Babesia ovata*: バベシア オバタ) への CRISPR/Cas9 系の応用も、併行して進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hakimi, H., Ishizaki, T., Kegawa, Y., Kaneko, O., Kawazu, S., and Asada, M.	4. 巻 4(3)
2. 論文標題 Genome editing of Babesia bovis using the CRISPR/Cas9 system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 mSphere	6. 最初と最後の頁 e00109-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSphere.00109-19	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 Nguyen, TT., Dang-Trinh, MA., Higuchi, L., Mosqueda, J., Hakimi, H., Asada, M., Yamagishi, J., Umemiya-Shirafuji, R., and Kawazu, S.	4. 巻 8(3)
2. 論文標題 Initiated Babesia ovata sexual stages under in vitro conditions were recognized by anti-CCp2 antibodies, showing changes in the DNA content by imaging flow cytometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 pii: E104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens8030104	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 該当する
1. 著者名 Mosqueda, J., Hidalgo-Ruiz, M., Calvo-Olivera, DA., Hernandez-Silva, DJ., Ueti, MW., Mercado-Uriostegui, MA., Rodriguez, A., Ramos-Aragon, JA., Hernandez-Ortiz, R., Kawazu, SI., and garashi, I.	4. 巻 146(13)
2. 論文標題 RON2, a novel gene in Babesia bigemina, contains conserved, immunodominant B-cell epitopes that induce antibodies that block merozoite invasion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 1646-1654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0031182019001161	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 該当する
1. 著者名 Hakimi, H., Templeton, TJ., Sakaguchi, M., Yamagishi, J., Miyazaki, S., Yahata, K., Uchihashi, T., Kawazu, SI., Kaneko, O., and Asada, M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Novel Babesia bovis exported proteins that modify properties of infected red blood cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1008917.	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Thu-Thuy Nguyen, Minh Anh Dang Trinh、樋口留菜、Juan Mosqueda、Hassan Hakimi、麻田正仁、山岸潤也、梅宮-白藤梨可、河津信一郎
2. 発表標題 Babesia ovata tick stages induced under in vitro conditions: Observation of morphological and ploidy changes.
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 Kawazu Shin-ichiro
2. 発表標題 Studies on development and application of gene manipulation methodologies for investigation of gene function and lifecycle of Babesia parasites
3. 学会等名 第14回国際寄生虫会 (ICOPA XIV) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asada Masahito, Hakimi Hakimi, Yamagishi Jyuya, Sakaguchi Miako, Yahata Kazuhide, Kawazu Shin-ichiro, Kaneko Osamu
2. 発表標題 Babesia bovis ves1 expression is correlated with cytoadhesion of parasite-infected erythrocyte to the endothelial cells
3. 学会等名 第14回国際寄生虫会 (ICOPA XIV) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamagishi Junya., Asada Masahito, Hakimi Hasan, Kawazu Shin-ichiro
2. 発表標題 Whole-genome assembly of Babesia parasite with long-read sequencers
3. 学会等名 第14回国際寄生虫会 (ICOPA XIV) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hakimi H., Templeton T.J., Sakaguchi M., Yamagishi J., Yahata K., Kawazu S., Kaneko O., and Asada M.
2. 発表標題 The expression of a novel multigene family is correlated with channel activity in Babesia bovis-infected erythrocytes.
3. 学会等名 第89回日本寄生虫学会大会 口頭発表(集会中止・誌上発表)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asada M., Hassan H., and Kawazu S.
2. 発表標題 Studies on development of Babesia parasites using the gene manipulation and bioimaging analysis.
3. 学会等名 5th International Livestock Biotechnology Symposium. (Zoom meeting) シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帯広畜産大学 原虫病研究センター(日本語版) https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/ 帯広畜産大学 原虫病研究センター(英語版) https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/en

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	麻田 正仁 (ASADA Masahito) (40587028)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	新川 武 (ARAKAWA Takeshi) (50305190)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授 (18001)	
研究分担者	山岸 潤也 (YAMAGISHI Jyunya) (80535328)	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授 (10101)	

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			
メキシコ	ケレタロ自治大学			
チェコ	チェコ科学アカデミー			