

平成 22年 5月 31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780225
 研究課題名（和文）バベシア・ギブソニの非ヘム鉄取込み機構の解明：鉄代謝を標的とした治療戦略に向けて
 研究課題名（英文）A study for a mechanism of iron uptake in *Babesia gibsoni*

研究代表者
 松鶴 彩（AYA MATSUU）
 鳥取大学・農学部・准教授
 研究者番号：40348595

研究成果の概要（和文）：

犬赤血球内寄生原虫である *Babesia gibsoni* 培養系に Deferoxamine、トランスフェリン (Tf) およびラクトフェリン (Lf) を添加したところ、Deferoxamine による原虫の増殖抑制作用が認められた。培養液中に添加した ^{59}Fe の赤血球への鉄取込みは添加直後に開始され、感染赤血球および非感染赤血球の間に差は認められなかった。 ^{59}Fe -Tf の取込みは認められなかった。Far Western Blot 法により、*B. gibsoni* 感染赤血球由来可溶性蛋白中に存在する Tf および Lf 結合蛋白は確認されなかった。以上の結果から *B. gibsoni* の非ヘム鉄の取込みは宿主赤血球の能動的な鉄取込みのみに依存するものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

B. gibsoni is a canine intraerythrocytic apicomplexan parasite. We performed some experiment associated with iron uptake activity in *B. gibsoni*. First, we evaluated the growth effect of deferoxamine (iron chelator), Transferrin (Tf) and Lactoferrin (Lf) on the *in vitro* growth of *B. gibsoni*. The growth of this parasite was significantly suppressed in containing deferoxamine, but was not inhibited in containing Tf or Lf. Next, ^{59}Fe uptake activity was detected in both infected and uninfected erythrocytes, but ^{59}Fe -Tf was not taken up by both erythrocytes. Finally, we performed far-western blotting to detect Tf-binding or Lf-binding protein from *B. gibsoni*. In the result, we could not confirm significant protein binding to Tf or Lf. In conclusion iron uptake activity of *B. gibsoni* may not dependent to host Tf or Lf.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：*Babesia gibsoni*, 鉄取込み、治療、感染症

1. 研究開始当初の背景

犬の *Babesia gibsoni* 感染症は、アピコンプレキサ属ピロプラズマ目原虫である *B. gibsoni* の赤血球内寄生に基因する溶血性貧血を主徴とする疾患である。本感染症は宿主に重篤な溶血性貧血を引き起こし、無治療で経過した場合約 30% の死亡率を有する。回復後も不顕性感染へと移行しキャリアーとして感染源となることから薬剤による原虫制圧が必要不可欠であるにもかかわらず、現在までに本原虫を宿主体内から排除することが可能な薬剤の報告はない。我々はこれまでに本原虫の治療に向けた研究に着手し、その中で *B. gibsoni* の長期連続培養株の確立に成功した。これにより本原虫の代謝機構に関わる研究に関する研究をより詳細に行うことが可能となった。

我々は原虫の鉄利用について着目し、その代謝機構を解明することにより原虫制圧に向けた新たな標的を見出すことを最終的な目的として、本研究ではまず原虫の鉄取込み機構についての研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では *B. gibsoni* の鉄取込み機構について解明することを目的として、1) 鉄関連化合物が連続培養 *B. gibsoni* の増殖に及ぼす影響を確認し、続いて 2) 培養液中鉄の感染赤血球内への取込みを確認した。さらに 3) 原虫感染赤血球膜におけるトランスフェリン (Tf) およびラクトフェリン (Lf) 結合能について解析を行った。

3. 研究の方法

1) 鉄関連化合物が連続培養 *B. gibsoni* 増殖に及ぼす影響：牛血清添加培養液に馴化させた *B. gibsoni* 培養株 (b-*B. gibsoni*) を用い、培養液中に鉄キレート剤である Deferoxamine を添加し、培養 72 時間後に塗抹標本を作成し parasitemia (正常赤血球に対する感染赤血球の割合) を測定、増殖抑制作用の有無について確認した。続いて犬血清添加培養液に馴化させた *B. gibsoni* 培養株 (c-*B. gibsoni*) および b-*B. gibsoni* を用い、それぞれの培養液に犬および牛由来 Tf、牛由来 Lf を添加し、同様に増殖抑制作用について検討を行った。

2) 培養液中鉄の感染赤血球内への取込み：b-*B. gibsoni* 株を用いて培養液に放射性同位

体 ^{59}Fe あるいは ^{59}Fe 標識 Tf (^{59}Fe -Tf) を添加し、添加直後、1 時間、4 時間後の赤血球内への ^{59}Fe 取込みについて解析を行った。3) 感染赤血球における Tf および Lf 結合能についての解析：感染赤血球から膜ゴーストを抽出した。Far Western Blotting 法によりビオチン化 Tf および Lf を用いて、感染赤血球由来可溶性蛋白中の Tf および Lf 結合蛋白の発現を解析した。

4. 研究成果

1) Deferoxamine 添加により原虫増殖は明らかに抑制された ($\text{IC}_{50}=6.24 \pm 3.43 \mu\text{M}$)。この増殖抑制効果は塩化鉄の添加により阻害された (図 1)。二種類の培養株において牛および犬由来 Tf、牛由来 Lf は明らかな *B. gibsoni* 抑制作用を示さなかった。

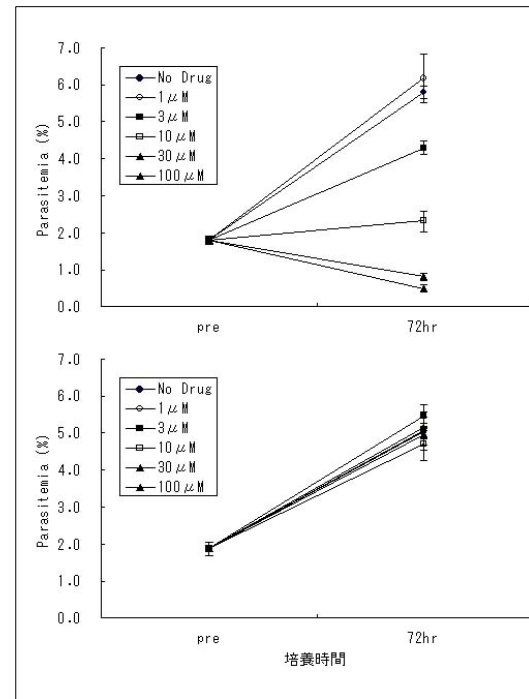


図 1. Deferoxamine 添加による *B. gibsoni* 増殖抑制効果。上図：培養液に 1-100 μM の Deferoxamine を添加したところ、72 時間後に原虫の増殖抑制が確認された。下図：培養液中に FeCl_3 1mM を添加したところ、Deferoxamine の増殖抑制作用は抑制された。

2) 培養系に、放射線同位元素である ^{59}Fe を添加したところ、感染赤血球および非感染赤血球内への鉄取込みは添加直後に開始され、両赤血球の間に有意な差は認められなかった (図 2)。また ^{59}Fe -Tf 添加後の赤血球内 ^{59}Fe 取込みは確認されなかった。

3) Far Western Blotting 法により感染および非感染赤血球における Tf および Lf 結合能

を解析したところ、明らかな結合蛋白の存在は認められなかった。

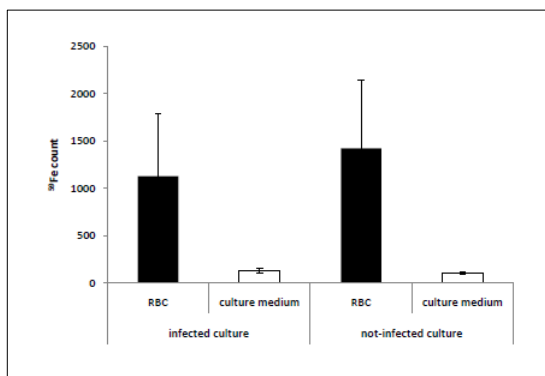


図2. 感染赤血球(Infected culture)および非感染赤血球 (not-infected culture) を浮遊させた培養系に、⁵⁹Fe を添加し、直後に赤血球内および培養液中の ⁵⁹Fe を測定した。⁵⁹Fe は両培養系において赤血球内に速やかに取り込まれた。

本課題では *B. gibsoni* 感染赤血球の鉄取込み機構について解析することを目的に複数の研究を行った。鉄(Fe³⁺)キレート剤である Deferoxamin の培養液中存在により原虫増殖が抑制されたことから、原虫の生存および増殖にはヒム鉄である Fe³⁺が必須であることが示唆されたが、Tf および Lf による原虫増殖への影響は確認されなかった。以前の研究で Lf は馬バベシア症の原因原虫である *B. caballi* の増殖を抑制するが、*B. equi* では増殖抑制作用が認められなかったことが報告されている。同じバベシア属原虫であっても Tf および Lf の作用には差がある可能性がある。また本研究では原虫感染赤血球が培養液中 ⁵⁹Fe を速やかに取込むことを確認したが、この取込みは感染赤血球に特異的なものではなく、正常な犬赤血球においても認められた。しかし Tf-⁵⁹Fe を添加した際、両赤血球へは ⁵⁹Fe の赤血球内への取込みは認められなかったことから、原虫は宿主 Tf に依存しない能動的な取込みのみ依存する可能性が示された。このことは感染赤血球由来蛋白中に Tf および Lf 結合蛋白発現が認められなかったことから裏付けられた。

原虫の鉄取込み機構は多様であり、これまでの報告で、*Trypanosoma* 族や *Leishmania* 属原虫はその表面に、宿主 Tf あるいは Lf 結合蛋白を発現していることが示されている。一方 *Plasmodium* 属原虫では宿主赤血球におけるエネルギー非依存性の鉄取込みのみに依存している可能性が示唆されている。今回行った研究から *B. gibsoni* では *Plasmodium* 属原虫と同様の機構により鉄の取込みが行われている可能性が推測される。本研究で得ら

れた成果は、今後原虫の鉄代謝をに関連する新たな標的の探索に重要な情報源となることが期待される。また Deferoxamine による in vitro での原虫増殖抑制作用から、今後 in vivo における治療効果の確認、本薬剤と相乗作用を有する薬剤の探究など、新たな治療方法の確立に向けた研究につながるものと考えている。

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 1 件)

① Aya MATSUU, Masahiro YAMASAKI, Xuenan XUAN, Hiromi IKADAI, Yoshiaki HIKASA. In vitro evaluation of the growth inhibitory activities of 15 drugs against *Babesia gibsoni* (Aomori strain). *Veterinary Parasitology* 71 : 379-381.2009.

[学会発表] (計 2 件)

① 松鶴 彩: 犬バベシア症の診断・治療最前線 2009. アトバコンを中心とした新しい治療法 動物臨床医学会 2009, 大阪

② 松鶴 彩: 犬バベシア症の治療. 日本獣医内科学アカデミー/日本獣医臨床病理学会 2009, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松鶴 彩 (AYA MATSUU)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40348595

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：