

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07739

研究課題名(和文) DNAマイクロアレイを用いたジミナゼン耐性バベシア原虫の原因遺伝子の検索

研究課題名(英文) Study on the responsible gene for the diminazene-resistant *Babesia gibsoni* using the DNA microarray.

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では犬の赤血球内原虫である *Babesia gibsoni* のジミナゼン製剤に対する薬剤耐性獲得について、その原因となる遺伝子を網羅的に検索するために DNA マイクロアレイを用いて解析を行うことを計画したが、*B. gibsoni* のゲノム情報がほとんどなく解析が困難であったことから情報が少なくとも網羅的な解析を実施可能と考えられた次世代シーケンサーによる解析に変更しゲノム解析を実施した。その結果、1,300以上の塩基配列が得られ、多くの遺伝子の断片を得られた。

研究成果の概要(英文)：In this study, responsible genes for the diminazene-resistance of *Babesia gibsoni*, a blood protozoan in dogs, was analyzed. At first, we tried to use the DNA microarray for this investigation. However, there are less reference genes of *B. gibsoni* for this analysis. Therefore, we tried to use the next generation sequencer, which would not require the reference genes for the analysis. As a result, we obtained over 1,300 sequences, and huge numbers of partial sequence of genes of *B. gibsoni*.

研究分野：獣医内科学

キーワード：バベシア症 *Babesia gibsoni* ジミナゼン製剤 薬剤耐性 DNAマイクロアレイ 次世代シーケンサ

1. 研究開始当初の背景

バベシア原虫はマダニにより媒介され、哺乳動物に感染することで発熱や溶血性貧血、血小板減少症などを主徴とする家畜バベシア症を引き起こす。家畜バベシア症は世界中で報告されており、産業動物においては多大な経済的損失を引き起こす。このため、より良い予防法、治療法の開発が望まれている。伴侶動物においては重大な健康被害を引き起こし、重篤な場合には死に至るため同様により良い治療法と予防法の開発が期待されており、その達成に向けて世界中で多くの研究者が新規治療薬の開発に努力している。しかしながら、バベシア原虫は薬剤耐性を獲得することが証明されてきており、動物の体内から完全に排除することが困難であり、しばしば再発を起こすほか、再発時には薬剤の効果低下することが問題となっている。

犬バベシア症においては、古典的な治療薬としてジミナゼン製剤 (DA) が用いられているが、これまでに筆者らが、犬のバベシア原虫である *Babesia gibsoni* が DA に耐性を獲得することを *in vitro* で証明し、報告している。その後、これまでに DA 耐性 *B. gibsoni* の解析を行い、ミトコンドリア DNA に変異は起こっておらず、それらの発現量も大きくは変化していないこと、DA 耐性原虫は増殖が悪いものの、エネルギー代謝が活性化していること、HSP90 の発現量が低下していること、原虫体内の DA 濃度が低下していること、などを明らかにしてきたが、DA 耐性獲得の根幹となるメカニズムについては明らかにできていない。このことに関して、個別に検討している DA 耐性獲得機序の原因になかなか迫れないと考えられたため、網羅的に DA 耐性原虫と野生株の違いを検索することが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

申請者らは、*in vitro* にて培養している *B. gibsoni* の野生株と DA 耐性株の遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて比較することにより DA 耐性の原因遺伝子を探索することを立案した。この研究には *in vitro* にて培養、維持されている DA 耐性株が必要であるが、申請者の異動によりこれまで解析に用いていた DA 耐性株が失われてしまったため、まずは DA 耐性株を再度確立する必要があった。そこで研究計画として期間内に以下のことを達成することを目標とした。

(1) DA 耐性株を作成するために培養している *B. gibsoni* を低濃度から DA を含んだ培地に馴化させていき、最終的に DA 耐性株を作成する。

(2) 作成した DA 耐性株と野生株について RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いてそれらの遺伝子発現量を網羅的に定量し、比較することで DA 耐性に関与するであろう遺伝子の候補を特定する。

(3) 上記で得られた候補遺伝子についてリ

アルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現量の変化を確認し、発現量に変化している遺伝子についてはクローニングを行い、遺伝子全長の塩基配列を決定する。

以上の研究を行い、*B. gibsoni* の DA 耐性獲得機序に関与する遺伝子を同定することを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

上記の様に、当初の計画を立案したが、研究において様々な困難に出会ったため、いくつかの計画を変更して研究を実施した。

(1) DA 耐性 *B. gibsoni* の作成

DA 耐性株の作成は、過去の報告の通りに実施したものの、当初は上手く作成できなかった。原因として考えられたことは、申請者が前住地では犬の赤血球のうち特殊な HK 型犬赤血球を用いており (本赤血球はその性質が網状赤血球に近く、*B. gibsoni* が網状赤血球でよく増殖することも申請者らが報告済み)、これにより効率良く DA 耐性株を作成できたものの、岩手大学においては HK 型が入手できず、通常の LK 型犬赤血球で培養を行っていたため、DA 耐性株の作成が困難であったと思われた。そこで、過去の報告では DA の培地中の終濃度が 200 ng/mL としたものを 50 ng/mL とした。

また、DNA マイクロアレイを実施するにあたり、リファレンス遺伝子が必要であるが、バベシア原虫では同様の解析が行われていないため、リファレンス遺伝子の情報を入手することが困難であった。近縁のバベシア原虫で利用できる情報があったものの、これらの製作費用が非常に効果で、かつ十分に信頼できる結果が得られるかどうか疑問であったことから、DNA マイクロアレイ以外の方法について検討を行った。その結果、次世代シーケンサーによる解析はある程度のリファレンス遺伝子が存在すれば解析が可能であり、かつ DNA マイクロアレイよりも容易に実施可能であったため、こちらを利用して網羅的な検索を行うことにした。ただし、本研究課題では上記の DA 耐性株の作成に手間取ったため、リファレンス遺伝子とするゲノム解析のみを次世代シーケンサーで実施することとした。

4. 研究成果

本研究課題では、まず DA 耐性 *B. gibsoni* の作成を実施した。1 年程度、培養条件を変更しながら 200 ng/mL の DA を含む培地での培養を試みたが原虫が死滅するため、方針を変更して 50 ng/mL の濃度で増殖する *B. gibsoni* の作成を行った (図 1)。DA に感受性の野生株の DA に対する IC₅₀ を求めたところ、72 時間での IC₅₀ は 45.6 ± 29.7 ng/mL であったのに対し、DA 耐性株では 72 時間での IC₅₀ が 2047.3 ± 1505.5 ng/mL であったことから、DA 耐性株が DA に対する抵抗力を獲得していることが確認された。また、過去

に作成した DA 耐性株においては、HSP70 と HSP90 の発現量が低下していたことからこのことも確認したところ、両者とも発現量が低下していたことから (図 2、3)、培養液中の DA 濃度が 50 ng/mL までしかあげられなかったものの、この DA 耐性株は過去に作成したものと類似の性質を有していると考えられた。ここまでに約 2 年の時間を要してしまっ

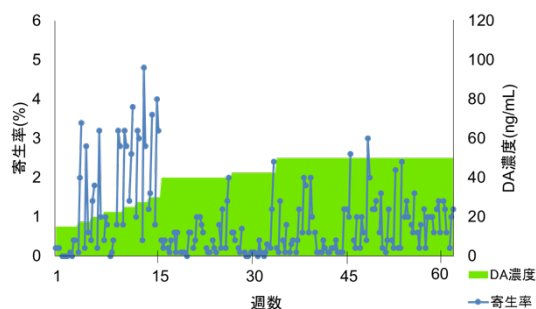


図 1. DA 耐性 *B. gibsoni* の作成 : 約 60 週で作成に成功した。原虫の増殖がやはり弱かった。

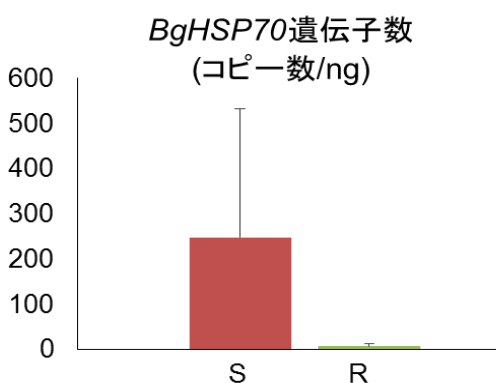


図 2. DA 耐性株の *HSP70* 遺伝子発現量 : DA 耐性株 (R) において野生株 (S) よりも低下していた。

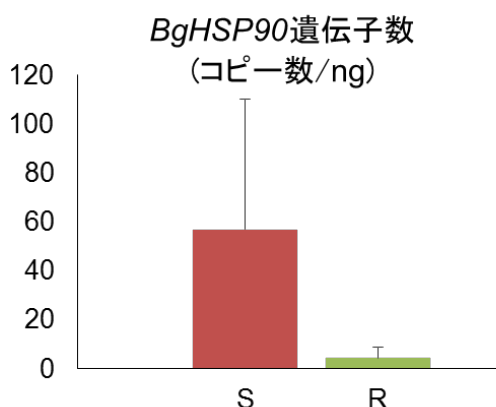


図 3. DA 耐性株の *HSP90* 遺伝子発現量 : DA 耐性株 (R) において野生株 (S) よりも低下していた。

DA 耐性株を得ることができたため、次に DNA マイクロアレイの実施について検討したが、結果として DNA マイクロアレイの実施は

取りやめ、次世代シーケンサーによる解析を利用することにした。次世代シーケンサーによる解析を行うために、培養している DA 耐性株について培養量を 12 mL まで増量し、原虫のみを回収してゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型として、岩手大学農学部設置されているイルミナ社製の次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、多くの塩基配列が得られた。このデータを専用の解析 PC にて解析を行い、コンティグの作成を行ったところ、約 1,300 の遺伝子断片が得られた。この全てについて BLAST 検索を実施したところ、いくつかの遺伝子は *B. gibsoni* の遺伝子として予想されたが、多くは未知の遺伝子であった。これは、*B. gibsoni* の遺伝子情報がほとんど利用できないためと思われる。また、解析を行うと、複数の犬の遺伝子が混入していることが明らかになった。このことは、*B. gibsoni* の培養には犬赤血球を必要とするが、避けられない犬白血球の混入があり、この犬白血球由来の DNA も同時に解析されてしまったものと思われる。結果として、より長いコンティグを作成し、*B. gibsoni* の全ゲノム配列を明らかにするためには、この様な犬の遺伝子を取り除き、さらに複数回の次世代シーケンスによる解析が必要であると考えられた。しかしながら、この様な情報でも遺伝子発現量の変化を解析する RNA-seq 解析のためのリファレンス遺伝子で利用可能であると考えられた。

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 2 件)

① Yamasaki, M., Watanabe, N., Idaka, N., Yamamori, T., Otsuguro, K., Uchida, N., Iguchi, A., Ohta, H., Takiguchi, M. (2017) Intracellular diminazene aceturate content and adenosine incorporation in diminaene aceturate-resistant *Babesia gibsoni* isolate *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 183: 92-98. (査読あり)

② Yamasaki, M., Tsuboi, Y., Taniyama, Y., Uchida, N., Sato, R., Nakamura, K., Ohta, H., Takiguchi, M. (2016) Molecular cloning, phylogenetic analysis and heat shock response of *Babesia gibsoni* heat shock protein 90. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 1355-1360. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

①益田美佐、井口愛子、内田直宏、佐藤れえ子、山崎真大、*Babesia gibsoni* 感染犬における膝炎併発に関する回顧的研究、第 38 回動物臨床医学会年次大会、2017. 11. 18. グランキューブ大阪（大阪市）

②山崎真大、伊藤みのり、宍戸智、井口愛子、内田直宏、小林沙織、佐藤れえ子、岩手県で発生した *Babesia odocoilei* 様原虫を原因とする犬バベシア症の 3 例、第 38 回動物臨床医学会年次大会、2017. 11. 18. グランキューブ大阪（大阪市）

③伊藤みのり、額田優花、井口愛子、内田直宏、小林沙織、佐藤れえ子、山崎真大、イヌ、ヒツジ、およびウシにおける *Babesia odocoilei* 様原虫の HSP70 遺伝子の検出、第 86 回日本寄生虫学会大会、2017. 5. 28. 北海道大学（札幌市）

④山崎真大、渡邊夏央、井高菜月、大田寛、滝口満喜、ジミナゼン耐性 *Babesia gibsoni* 株の細胞内ジミナゼン濃度の測定、第 62 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部会合同大会、2016. 10. 15. 北里大学獣医学部（青森県十和田市）

〔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

山崎 真大 (YAMASAKI Masahiro)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号：40322846

(2) 研究分担者

今井 正樹 (IMAI Masaki)
東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：30333363

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()