

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08021

研究課題名(和文)パベシア原虫メロゾイト滑走運動機構の解明

研究課題名(英文)Study on gliding motility of Babesia bovis merozoite

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：家畜寄生原虫の運動性や宿主細胞侵入性はその生存にとって必須の機能であり、宿主への病原性とも密接なつながりを持つ。本研究では、パベシア原虫メロゾイトの滑走運動の分子機序解析を行い、Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) 関連遺伝子の一つが赤内期原虫の生存に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、パベシア原虫において初めて遺伝子ノックダウン法やゲノム編集法、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)バイオセンサーを用いたイメージング法を確立することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、パベシア原虫メロゾイト滑走運動の分子機序を明らかにするまでには至らなかったが、同原虫TRAP関連遺伝子の一つが赤内期の生存に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、技術的な面からはパベシア原虫において初めて2種類の遺伝子ノックダウン法を確立したほか、CRISPR/Cas9法によるゲノム編集法を確立し、さらにFRETバイオセンサーを用いたイメージングに成功するなど顕著な進捗が見られた。遺伝子ノックダウン法やゲノム編集法は寄生体のゲノム機能解析に非常に有効なツールであるため、今後パベシア病研究の加速が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Babesia bovis is an apicomplexan intraerythrocytic protozoan parasite that induces babesiosis in cattle after transmission by ticks. During specific stages of the apicomplexan parasite lifecycle, host cells are targeted for invasion using a unique, active process termed "gliding motility". We have reported gliding motility of B. bovis merozoites, however molecular mechanisms of gliding motility have not been elucidated. In this study, we have searched the genes related to the glideosome, and found 5 thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) genes. The single gene knockout experiment revealed that four of the TRAP genes were dispensable. On the contrary, we failed to disrupt one of the TRAP gene. The glmS gene knock down system was developed for Babesia parasites and adopted to the TRAP gene, and we found the gene has an important role for intraerythrocytic stage of the parasite.

研究分野：獣医学

キーワード：パベシア ウシ 滑走運動 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

家畜寄生原虫の運動性や宿主細胞侵入性はその生存にとって必須の機能であり、宿主への病原性とも密接なつながりを持つ。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、発熱、貧血、黄疸や血色素尿等の症状を引き起し、時に宿主を死に至らしめる。なかでもバベシア・ボビス (*Babesia bovis*) は病原性が高いことから、ピロプラズマ病として家畜伝染病に指定されているが、その赤血球寄生メカニズムの解明は進んでいない。研究代表者はこれまでにバベシア・ボビスの赤血球寄生ステージであるメロゾイトが滑走運動を示すことを発見した。アピコンプレクサ門原虫の滑走運動は主にトキソプラズマ原虫において研究が進められているが、バベシア原虫に近縁の赤血球寄生原虫であるマラリア原虫のメロゾイトでは滑走運動は見られないとされている。

2. 研究の目的

本研究は *B. bovis* を対象とし、バベシア原虫メロゾイトの滑走運動の分子機序を明らかにすることで、原虫の増殖を抑制する新たな作用機点を見出すことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 滑走運動関連遺伝子の探索

トキソプラズマ原虫においては滑走運動に関連する分子が複数報告されている。そこで、滑走運動関連遺伝子のバベシア原虫におけるオルソログや、滑走運動関連分子と同じドメイン構造を持つタンパク質をコードする遺伝子について検索を行った。

(2) TRAP 遺伝子ノックアウト原虫の作出

Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) 関連遺伝子が 5 種類見つかったため、それぞれについてシングルノックアウト原虫の作出を試みた。

(3) 遺伝子ノックダウン法並びにゲノム編集法の確立

TRAP 遺伝子の 1 つについてはノックアウト株が得られなかったため、誘導型遺伝子ノックダウン法並びにゲノム編集法の確立を行った。誘導型遺伝子ノックダウン法として gImS リボザイム法並びに、ProteoTuner Shield System の確立を行った。ゲノム編集法として CRISPR/Cas9 システムの確立を行った。

(4) TRAP5 遺伝子誘導型ノックダウン原虫の作出

TRAP5 遺伝子について、gImS 法を用いた誘導型遺伝子ノックダウン原虫株の作製を行った。得られた原虫株について表現型解析を行った。

(5) HyPer 発現原虫の作出

滑走運動中のメロゾイトにおける酸化ストレス状態をモニタリングするため、 H_2O_2 インディケータタンパク質 HyPer を発現する原虫を作出し、タイムラプスイメージングを行った。

4. 研究成果

(1) 滑走運動関連遺伝子の探索

アピコンプレクサ門原虫の滑走運動に関わる構造はグライデオソームと呼ばれ、トキソプラズマ原虫の研究などから、細胞内膜複合体とアクトミオシン複合体の分子、さらには細胞膜上に存在する TRAP ファミリータンパク質などが知られている。そこで、バベシア原虫においても同様のタンパク質をコードする遺伝子が存在するか検索を行った。その結果、5 つの TRAP ファミリー遺伝子のほか、Coronin タンパク質遺伝子、GAP45 遺伝子などが存在することが明らかになっ

た。

(2)TRAP 遺伝子ノックアウト原虫の作出

5つの TRAP ファミリー遺伝子についてそれぞれシングルノックアウト原虫の作出を試みた。その結果、TRAP1-4 遺伝子については、それぞれノックアウト原虫が得られたのに対し、TRAP5 遺伝子は3回ノックアウト実験を試みたが、いずれも目的とする原虫は得られなかった。

(3)遺伝子ノックダウン法並びにゲノム編集法の確立

遺伝子ノックダウン法として、最初に ProteoTuner Shield System を使用した GFP-DD 発現原虫を作製した。GFP-DD 発現原虫は緑色蛍光タンパク質(GFP)に degradation domain(DD)を融合したタンパク質を過発現する *B. bovis* である。得られた原虫は Shield の添加により緑色蛍光が観察され、一方で Shield を培地から抜くことで緑色蛍光が消失し、ProteoTuner Shield System が機能していることが確認された。しかしながら、同システムはプロテアソーム系を介したタンパク質発現制御法の為、原虫の細胞膜上に分泌されるタンパク質の制御には向かないと判断し、リボザイムを使用した gImS 法の確立を行った。特別研究員奨励費 16F16105 により同定され、その後遺伝子ノックアウト原虫が得られなかったバベシア原虫遺伝子について、gImS 配列を導入し、得られた組換え原虫に対し、グルコサミンを投与した。すると、タンパク質発現量の減少と、原虫寄生率の低下がみられ、gImS 法についてもバベシア原虫において機能することが確認された。さらに、バベシア原虫について CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム編集法についても確立を行った。バベシア原虫のプロモータにより制御される *cas9* 遺伝子やガイド RNA を含むプラスミドを構築し、標的遺伝子へのタグ配列の挿入、突然変異の導入、遺伝子のノックアウトを行った (Hakimi et al., 2019)。タグ配列の挿入のためゲノム編集法を用い *sbp-3* 遺伝子に *myc* タグを導入し、間接蛍光抗体法にて SBP3 タンパク質が原虫感染赤血球に局在することを確認した。また、抗酸化タンパク質である TPx-1 タンパク質の酵素活性部位に存在するシステインをアルギニンに置換するような変異を導入した原虫株及び *tpx-1* 遺伝子をノックアウトした原虫株をゲノム編集法にて作出した。得られた原虫株については、*tpx-1* 遺伝子座への変異導入や、遺伝子の破壊を確認した上で、NO ドナーであるニトロプルシドナトリウム(SNP)に対する感受性試験を行った。その結果、*tpx-1* 遺伝子ノックアウト株では SNP に対する有意な感受性上昇がみられ、一方、変異導入株では親株とノックアウト株の間となる表現型が得られた。

(4)TRAP5 遺伝子誘導型ノックダウン原虫の作出

gImS 法を用いた遺伝子ノックダウン法を確立できたため、TRAP5 遺伝子について gImS 配列を導入した遺伝子組換え株を作製した。得られた株についてグルコサミンを投与した結果、有意な原虫感染率の低下がみられ、TRAP5 が原虫の赤血球寄生に重要な役割を果たすことが明らかになった。得られた原虫株については詳細な表現型解析を継続中であり、TRAP5 がバベシア原虫の滑走運動や赤血球侵入のいずれの段階で機能しているのか明らかにする予定である。

(5)HyPer 発現原虫の作出

本研究課題の一環として、滑走運動中のメロゾイトにおける酸化ストレス状態をモニタリングするため、蛍光 H₂O₂ インディケータータンパク質 HyPer を発現する原虫を作出した (Asada et al., 2018)。得られた原虫の発する蛍光を観察した所、細胞質内においてその局在が均一ではなかったため、オルガネラ染色を行い、その局在解析を行ったところ、蛍光はミトコンドリア染色とほぼ一致し、活性酸素種の発生が主にミトコンドリア近傍であることが判明した。また、滑走運動中のメロゾイトにおいても一貫して HyPer の蛍光が観察され、原虫細胞内で恒常的に活性酸素種が発生していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Liu Mingming, Ji Shengwei, Rizk Mohamed Abdo, Adjou Moumouni Paul Franck, Galon Eloiza May, Li Jixu, Li Yongchang, Zheng Weiqing, Benedicto Byamukama, Tumwebaze Maria Agnes, Asada Masahito, Xuan Xuenan	4. 巻 9
2. 論文標題 Transient Transfection of the Zoonotic Parasite Babesia microti	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 108 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9020108	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 Rosa Catarina, Asada Masahito, Hakimi Hassan, Domingos Ana, Pimentel Madalena, Antunes Sandra	4. 巻 10
2. 論文標題 Transient transfection of Babesia ovis using heterologous promoters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ticks and Tick-borne Diseases	6. 最初と最後の頁 101279 ~ 101279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ttbdis.2019.101279	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 Nguyen Thu-Thuy, Dang-Trinh Minh-Anh, Higuchi Luna, Mosqueda Juan, Hakimi Hassan, Asada Masahito, Yamagishi Junya, Umemiya-Shirafuji Rika, Kawazu Shin-ichiro	4. 巻 8
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 104 ~ 104
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 Hakimi Hassan, Sarani Ali, Takeda Mika, Kaneko Osamu, Asada Masahito	4. 巻 14
2. 論文標題 Epidemiology, risk factors, and co-infection of vector-borne pathogens in goats from Sistan and Baluchestan province, Iran	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0218609 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0218609	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 Hakimi Hassan, Ishizaki Takahiro, Kegawa Yuto, Kaneko Osamu, Kawazu Shin-ichiro, Asada Masahito	4. 巻 4
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-e00119
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 Liu Mingming, Adjou Mounouni Paul Franck, Asada Masahito, Hakimi Hassan, Masatani Tatsunori, Vudriko Patrick, Lee Seung-Hun, Kawazu Shin-ichiro, Yamagishi Junya, Xuan Xuenan	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of a stable transfection system for genetic manipulation of Babesia gibsoni	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 260 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-018-2853-1	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 Liu Mingming, Adjou Mounouni Paul Franck, Cao Shinuo, Asada Masahito, Wang Guanbo, Gao Yang, Guo Huanping, Li Jixu, Vudriko Patrick, Efstratiou Artemis, Ringo Aaron Edmond, Lee Seung-Hun, Hakimi Hassan, Masatani Tatsunori, Sunaga Fujiko, Kawazu Shin-ichiro, Yamagishi Junya, Jia Lijun, Inoue Noboru, Xuan Xuenan	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification and characterization of interchangeable cross-species functional promoters between Babesia gibsoni and Babesia bovis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ticks and Tick-borne Diseases	6. 最初と最後の頁 330 ~ 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ttbdis.2017.11.008	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 Asada Masahito, Hakimi Hassan, Kawazu Shin-ichiro	4. 巻 255
2. 論文標題 The application of the HyPer fluorescent sensor in the real-time detection of H2O2 in Babesia bovis merozoites in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary Parasitology	6. 最初と最後の頁 78 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetpar.2018.03.016	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 Yamagishi Junya, Asada Masahito, Hakimi Hassan, Tanaka Takeshi Q., Sugimoto Chihiro, Kawazu Shin-ichiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Whole-genome assembly of Babesia ovata and comparative genomics between closely related pathogens	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 832 ~ 832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-017-4230-4	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 Liu Mingming, Asada Masahito, Cao Shinuo, Adjou Moumouni Paul Franck, Vudriko Patrick, Efstratiou Artemis, Hakimi Hassan, Masatani Tatsunori, Sunaga Fujiko, Kawazu Shin-ichiro, Yamagishi Junya, Xuan Xuenan	4. 巻 216
2. 論文標題 Transient transfection of intraerythrocytic Babesia gibsoni using elongation factor-1 alpha promoter	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular and Biochemical Parasitology	6. 最初と最後の頁 56 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molbiopara.2017.07.003	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 Masatani Tatsunori, Hayashi Kei, Andoh Masako, Tateno Morihiro, Endo Yasuyuki, Asada Masahito, Kusakisako Kodai, Tanaka Tetsuya, Gokuden Mutsuyo, Hozumi Nodoka, Nakadohzo Fumiko, Matsuo Tomohide	4. 巻 8
2. 論文標題 Detection and molecular characterization of Babesia, Theileria, and Hepatozoon species in hard ticks collected from Kagoshima, the southern region in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Ticks and Tick-borne Diseases	6. 最初と最後の頁 581 ~ 587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ttbdis.2017.03.007	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 MUSINGUZI Simon Peter, SUGANUMA Keisuke, ASADA Masahito, LAOHASINNARONG Dusit, SIVAKUMAR Thillaiampalam, YOKOYAMA Naoki, NAMANGALA Boniface, SUGIMOTO Chihiro, SUZUKI Yasuhiko, XUAN Xuenan, INOUE Noboru	4. 巻 78
2. 論文標題 A PCR-based survey of animal African trypanosomosis and selected piroplasm parasites of cattle and goats in Zambia	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1819 ~ 1824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.16-0240	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 Masatani Tatsunori, Asada Masahito, Hakimi Hassan, Hayashi Kei, Yamagishi Junya, Kawazu Shin- ichiro, Xuan Xuenan	4. 巻 115
2. 論文標題 Identification and functional analysis of a novel mitochondria-localized 2-Cys peroxiredoxin, BbTPx-2, from Babesia bovis	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 3139 ~ 3145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00436-016-5071-9	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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hakimi H, Templeton TJ, Sakaguchi M, Kaneko O, Asada M
2. 発表標題 Proteomic approach leads to the identification of novel Babesia bovis proteins expressed on the surface of infected erythrocytes
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asada M, Hakimi H, Yamagishi J, Sakaguchi M, Yahata K, Kawazu S, Kaneko O
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 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hakimi H, Templeton TJ, Sakaguchi M, Kaneko O, Asada M
2. 発表標題 Proteomic approach leads to the identification of nobel Babesia bovis proteins expressed on the surface of infected
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hakimi H, Templeton TJ, Sakaguchi M, Kaneko O, Asada M
2. 発表標題 Proteomic approach leads to the identification of novel Babesia bovis proteins expressed on the surface of infected erythrocytes
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asada M, Hakimi H, Yamagishi J, Sakaguchi M, Yahata K, Kawazu S, Kaneko O
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 14th International Congress of Parasitology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 麻田正仁、ハキミハッサン、山岸潤也、坂口美亜子、矢幡一英、河津信一郎、金子修
2. 発表標題 Babesia bovis感染赤血球の宿主血管内皮細胞接着機構の解明
3. 学会等名 第24回分子寄生虫学ワークショップ/第14回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム
4. 発表年 2016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
研究協力者	晴希生 ハッサン (HAKIMI Hassan) (80745183)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	(現所属) 帯広畜産大学・原虫病研究センター・特任研究員

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河津 信一郎 (KAWAZU Shinichiro) (60312295)	帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授 (10105)	
研究協力者	テンブルトン トーマス (TEMPLETON Thomas)	長崎大学・熱帯医学研究所・客員教授 (17301)	
研究協力者	金子 修 (KANeko Osamu) (50325370)	長崎大学・熱帯医学研究所・教授 (17301)	
研究協力者	矢幡 一英 (YAHATA Kazuhide) (40467965)	長崎大学・熱帯医学研究所・助教 (17301)	