

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658242

研究課題名(和文)バベシア原虫でのライブイメージング実験系の開発

研究課題名(英文)Development of live cell imaging experimental system in babesia parasite

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：バベシア原虫で緑色蛍光タンパク質(GFP)を安定発現する実験系を構築して、同原虫でのライブイメージング実験系を確立した。(1)薬剤耐性遺伝子(hdhfr)と選択薬剤(WR99210)を応用してBabesia bovisでGFPを安定発現する実験系を構築した。また同原虫の遺伝子をノックアウトする実験にも初めて成功した。(2) GFP発現原虫のin vitro培養系を用いてタイムラプス解析を行い、バベシア原虫メロゾイトが滑走運動を行うことを初めて明らかにした。また、滑走運動の意義を考察するため、赤血球をウシのものに置換した重度複合免疫不全(SCID)マウスを用いたライブイメージング実験系も構築した。

研究成果の概要(英文)：The system for stable expression of green fluorescent protein (GFP) in babesia parasite was developed and the GFP-expressing parasite was observed through time-lapse video microscopy. (1) Stable expression of GFP in B. bovis using the WR99210/hDHFR selection system was achieved. The expression cassette was applied for the development of gene targeting (knockout) technique and the knockout parasite was established for the first time. (2) The gliding motility of B. bovis merozoites was revealed for the first time by in vitro time-lapse video microscopy of the GFP-expressing parasite. In vivo infection model of the parasite with SCID mice, with which a part of the circulating erythrocyte had been replaced with bovine cells, was also developed to investigate the gliding motility of the parasite in detail through time-lapse video microscopy.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・基礎獣医学

キーワード：獣医学 感染症 バベシア ライブイメージング 遺伝子改変原虫

## 1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫、トリパノソーマ原虫などヒト寄生性原虫では、生物特性の解明および、原虫病の治療・予防の基礎となる宿主・寄生体相互作用の解析を目的として、Green Fluorescent Protein (GFP)等蛍光タンパク質とゲノムの改変技術を駆使したライブイメージング研究が精力的に進められている。一方、バベシア原虫についても昨今そのゲノム情報の解析プロジェクトが進行し、ゲノム情報やESTなどのデータベースが整備されつつあるが、この人獣共通感染性原虫では、国内外を通じて、このようなライブイメージング研究の実績はない。申請者はこれまでに、ヒトおよびマウスマラリア原虫で遺伝子改変原虫を作製し、新規抗酸化タンパク質の機能解析を進めてきた。これらの経緯から、バベシア原虫においても、基礎生物学研究および、予防・治療法の開発研究を飛躍的に進展させるツールとして、ライブイメージング実験系を整備することが喫緊の課題であるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

バベシア原虫で GFP あるいは GFP 融合タンパク質を安定発現する実験系を構築する。これら実験系を応用して、バベシア原虫でのライブイメージング実験系を確立して、同原虫での基礎生物学研究の基盤を調えることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 緑色蛍光タンパク質 (GFP) 安定発現バベシア原虫の作出:

薬剤耐性遺伝子 (*dhfr*) を組み込んだ緑色蛍光タンパク質 (GFP) 発現プラスミド (DHFR-gfp) を構築し、ウシバベシア原虫 (*Babesia bovis*) 細胞に導入した。選択薬剤 (WR99210) 存在下の *in vitro* 培養と限界希釈法により GFP 発現クローンを得た。選択

薬剤を用いない安定発現系を構築する目的で、バベシア原虫での人工染色体の構築を試みた。同原虫のセントロメア配列を基本プラスミド DHFR-gfp に組み込み、人工染色体 DHFR-gfp-Bbcent2 を構築した。人工染色体を導入した *B. bovis* を薬剤無添加培地で継代して GFP の発現を追跡観察した。

### (2) 遺伝子ノックアウト系の確立:

*B. bovis* チオレドキシネルオキシダーゼ (BbTPx-1) のノックアウトを試みた。DHFR-gfp の両端に *Bbtpx-1* の 5' 及び 3' 配列を組み込んだプラスミド (ノックアウトコンストラクト) を作製し、原虫細胞に導入した。薬剤選択とクローニングの後、*Bbtpx-1* 遺伝子座の破壊及び BbTPx-1 の欠失をサザンブロット法、ウエスタンブロット法及び間接蛍光抗体法で確認した。

### (3) BbTPx-1 遺伝子ノックアウト *B. bovis* の表現型観察:

BbTPx-1 遺伝子ノックアウト原虫の *in vitro* 増殖を野生型と比較した。また、培地に親電子試薬を添加して、原虫細胞内に活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) を派生させ、増殖阻害を観察した。

### (4) GFP 発現原虫を用いたライブイメージング解析:

GFP 安定発現 *B. bovis* (GFP 発現原虫) のメロゾイトが赤血球より遊出し、赤血球に接着・侵入する過程について、共焦点レーザー顕微鏡によるタイムラプス解析を行った。

### (5) 重度複合免疫不全 (SCID) マウス感染実験系の作成:

SCID-Bo マウス (ウシ赤血球を移入した SCID マウス) を作製し、GFP 発現原虫の感染実験をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) GFP 安定発現バベシア原虫の作出:

DHFR-gfp 導入原虫を WR99210 5-10nM 添加培地で培養したところ、培養 10 日目に GFP

を発現する原虫細胞を確認した。GFP 発現原虫の比率はその後上昇した。その後限界希釈法によるクローニングを行い、GFP 発現原虫のクローンを複数株確立した。同クローンは薬剤存在下培養で1年以上 GFP を安定発現した。*B. bovis* セントロメア領域を DHFR-gfp に組み込んだ (DHFR-gfp-Bbcent2) 導入クローンを薬剤無添加培地で培養したところ、DHFR-gfp 導入原虫の約 60% がプラスミドを失う培養 60 日目においても 80% の原虫が GFP の発現を維持していた。以上の成績から、バベシア原虫において GFP を安定的に発現する実験系の構築に成功した (図 1)。

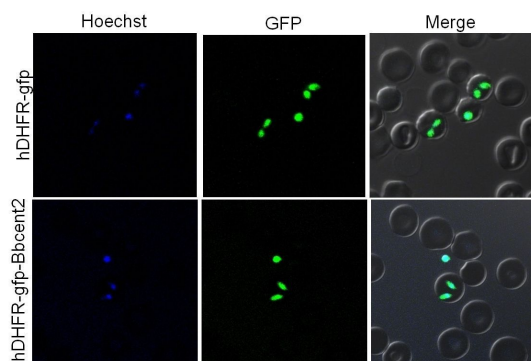


図 1 : GFP 発現バベシア原虫 DHFR-gfp 導入原虫 (上段) 及び人工染色体 (DHFR-gfp-Bbcent2) 導入原虫 (下段) において GFP (緑色) の発現が観察される。Hoechst (青色) は核染色、Merge は左二枚の重複イメージを示す。

### (2) 遺伝子ノックアウト系の確立:

ノックアウトコンストラクトを導入した *B. bovis* 原虫細胞を WR99210 5-10nM 添加培地で培養し、GFP を発現する原虫細胞をクローニングした。独立した実験で確立した 2 クローン (BbTPx-1 KO) について、*Bbtpx-1* 遺伝子座への薬剤耐性マーカーの挿入と同遺伝子座の破壊をサザンブロット法で確認した。また、BbTPx-1 失欠の表現型を、遺伝子特異的プライマーを用いた RT-PCR 法と、タンパク質特異抗体を用いたウエスタンブロット法及び間接蛍光抗体法で、それぞれ確認した。以上の成績から、バベシア原虫において任意

の遺伝子をノックアウトする実験系の構築に初めて成功した。

### (3) BbTPx-1 遺伝子ノックアウト *B. bovis* の表現型観察:

BbTPx-1 KO は無処理培地での *in vitro* 培養において野生型 (WT) と同等に増殖した。また、培地へパラコート (ROS ドナー) を添加すると、BbTPx-1 KO の増殖は阻害されたが、その程度は WT と同等であった。一方、培地へのニトロプルシドナトリウム (RNS ドナー) 添加において、BbTPx-1 KO の増殖は、WT に比較して有意に阻害された。このことから、BbTPx-1 の RNS 還元における役割が考察された。

### (4) GFP 発現原虫を用いたライブイメージング解析:

GFP 発現原虫の *in vitro* 培養系を用いてタイムラプス解析を行い、バベシア原虫赤血球型の増殖過程を観察した。その結果、バベシア原虫メロゾイトが滑走運動を行うことが初めて明らかとなった。また、滑走運動はトキソプラズマ原虫タキゾイトのヘリカルグライディング (旋回滑走) に類似していること、またその駆動系がアクチンミオシンモーターであることが明らかになった。

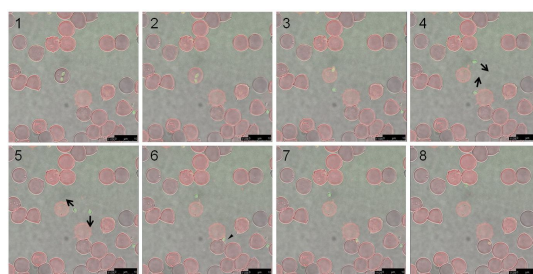


図 2 : バベシア原虫メロゾイトの滑走運動  
メロゾイトが感染赤血球から脱出して新しい赤血球に侵入するまでの様子を示す。1 : 画像の中央に GFP 発現原虫が観察される。2 : 赤血球内のメロゾイトが動き始め赤血球膜が破裂する。3 : 赤血球からメロゾイトが遊出する。4 - 5 : メロゾイトが滑走する。矢印は進行方向を示す。6 : メロゾイトが標的細胞 (矢頭) に接着する。7 - 8 : メロゾ

イトが標的細胞に侵入する。(画像提供 URL: <https://www.youtube.com/watch?v=seyLyRwITtg>)

#### (5) SCID マウス感染実験系の作成:

滑走運動の意義を考察するため、赤血球置換 SCID マウスを用いたライブイメージング実験を進めている。SCID-Bo マウスでの原虫感染赤血球比率(寄生率)は、感染赤血球の接種後4日目には10%に達し、その後は低下することが解った。共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージング観察により、肺や肝臓等マウス諸臓器において GFP 発現原虫が観察され、赤血球外において滑走運動を行うメロゾイトも観察された。SCID-Bo モデルは今後メロゾイトの滑走運動を解析する上で有用なツールと成り得ると考察される。

#### 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2件)

Masatani, T., Asada, M., Ichikawa-Seki, M., Usui, M., Terkawi, MA., Hayashi, K., Kawazu, S., and Xuan, X. Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Babesia gibsoni*. J. Vet. Med. Sci. 査読有 76(1): 139-143 (2013) DOI: <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.13-0274>

Asada, M., Goto, Y., Yahata, K., Yokoyama, N., Kawai, S., Inoue, N., Kaneko, O., and Kawazu, S. Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. PLoS ONE 査読有 7(4): e35227 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0035227.

##### [学会発表](計7件)

麻田正仁 他、バベシア原虫におけるダブルトランスフェクション法の確立、第83回日本寄生虫学会、2014年3月27日、愛媛大学城北キャンパス

Asada, M., and Kawazu, S. Study on gliding motility of *Babesia bovis* merozoites using bioimaging analysis. 6<sup>th</sup> ASEAN Congress of Tropical Medicine and Par

asitology (第6回ASEAN熱帯医学寄生虫学会議) 2014年3月7日、Intercontinental Hotel Kuala Lumpur (クアラルンプール、マレーシア)

麻田正仁 他、*Babesia bovis* チオレドキシニペルオキシターゼBbTPx-1ノックアウト原虫は活性窒素種負荷に対する感受性が上昇する、第156回日本獣医学会学術集会、2013年9月21日、岐阜大学

Asada, M., *et al.* Gliding motility of *Babesia bovis* merozoites visualized by time-lapse video microscopy. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 61<sup>th</sup> Annual Meeting (第61回米国熱帯医学会年会) 2012年11月13日、Atlanta Marriott Marquis (アトランタ、米国)

麻田正仁 他、*Babesia bovis* メロゾイト滑走運動のバイオイメージング解析、第10回分子寄生虫学マラリア研究フォーラム、2012年10月12日、群馬大学医学部

##### [図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

##### [その他]

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~tryp/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 分担研究者

##### (3) 連携研究者

辻 尚利 (TSUJI, Naotoshi)  
動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域・主任研究員  
研究者番号: 70355171