

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成27年 5月27日

採択番号	26共同-13		
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	河津 信一郎
研究課題名	バベシア原虫メロゾイトの赤血球遊出・滑走・侵入に関わるカルシウムイオン動態のライブイメージング解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名・役割分担	
	あさだ まさひと 麻田 正仁	長崎大学熱帯医学研究所・助教・ 研究の総括、Yellow cameleon発現バベシア原虫の作出、Ca ²⁺ ライブイメージング実験	
研究分担者	かねこ おさむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・教授 ・マラリア原虫との比較研究	
	やはた かずひで 矢幡 一英	長崎大学熱帯医学研究所・助教 ・カルシウムイオノフォア投与実験	
	モサード イーハブ Mossaad Ehab	帯広畜産大学原虫病研究センター・岐阜大学大学院連合獣 医学研究科博士課程 ・Ca ²⁺ イメージング実験	
	かわづ しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター ・Ca ²⁺ イメージング実験	
研究期間	平成26年 4月 1日 ～ 平成27年 3月31日		
目的・趣旨	バベシア原虫はアピコンプレクサ門に属し、ウシなどに感染し家畜に多大な経済的損失を与える住血原虫である。マラリア原虫やトキソプラズマ原虫等、同門の原虫は宿主細胞からの脱出や侵入にカルシウムイオン[Ca ²⁺]を利用していることが知られている。しかしながら、バベシア原虫においてメロゾイトの宿主赤血球への遊出・滑走・侵入における[Ca ²⁺]の役割はほとんど明らかとなっていない。本研究では申請者らが開発したウシのバベシア原虫 <i>B. bovis</i> における遺伝子改変技術を応用し、バベシア原虫の宿主赤血球への遊出・滑走・侵入における[Ca ²⁺]の役割を明らかにすることを目的としている。		
研究経過の概要	<i>B. bovis</i> の <i>in vitro</i> 培養感染血へのカルシウムイオノフォアA23187 投与実験により、原虫寄生率の有意な低下が観察され、A23187 による原虫細胞質[Ca ²⁺]の一過性の上昇が <i>B. bovis</i> メロゾイトの赤血球からの遊出を誘導したことが示唆された。本実験はバベシア原虫メロゾイトの宿主赤血球からの遊出が原虫細胞内カルシウムイオン濃度[Ca ²⁺]依存性であることを初めて見出した知見である。さらに、メロゾイト遊出時の細胞内カルシウムイオン[Ca ²⁺]の動態を明らかにするため、[Ca ²⁺]インディケータータンパク質 Yellow cameleon-Nano (YCnano50)を原虫細胞質内で発現する <i>B. bovis</i> を作出した。現在YCnano50 発現 <i>B. bovis</i> を用いた詳細なイメージング解析を進めているところである。		

受理年月日	受理番号

研究成果の概要	メロゾイトの遊出とカルシウムイオン[Ca²⁺]の関係を明らかにするため <i>B. bovis</i> の <i>in vitro</i> 培養感染血にカルシウムイオノフォア A23187 を投与し、投与後 10 分ごとに薄層塗抹標本を作製して原虫寄生率（赤血球内に留まるメロゾイトの割合）を算定した。その結果、A23187 投与群において投与 10 分後に寄生率の有意な低下が見られ、投与 20 分後、30 分後では有意な寄生率の上昇が観察された。このことから、A23187 による原虫細胞質[Ca²⁺]の一過性の上昇が <i>B. bovis</i> メロゾイトの赤血球からの遊出を誘導したことが示唆された。一方で、（１）メロゾイト遊出を誘導する A23187 の濃度が nM レベルと他のアピコンプレクサ門原虫でのそれ（μM レベル）より低い（２）E-64 を始めとするプロテアーゼインヒビターを培養原虫に添加し培養してもメロゾイトの遊出阻害を意味する双梨子状原虫の増加は観察されない、といったことから [Ca²⁺] 上昇以降から原虫の遊出までの分子機構はマラリア原虫でのそれとは異なることが示唆された。 さらに、<i>B. bovis</i> メロゾイト細胞質内[Ca²⁺]の動態を観察する目的で Yellowameleon-Nano (YCnano50) を発現する <i>B. bovis</i> を作出した。これまでに作製した <i>B. bovis</i> GFP 発現用プラスミドの <i>gfp</i> 遺伝子部分を YCnano50 に置換した発現用プラスミドを構築した。エレクトロポレーションによるプラスミドの原虫エピソームへの導入とその後の WR99210 による薬剤選択により、YCnano50 の発現を示す YFP 並びに CFP の蛍光が観察される原虫が得られた。YCnano50 発現 <i>B. bovis</i> 培養感染血にカルシウムイオノフォア A23187 を投与し、タイムラプスイメージングを行ったところ、原虫細胞質内[Ca²⁺]の一過性上昇を示す YFP/CFP シグナル比率の一過性上昇が見られ、その後感染赤血球膜の崩壊とそれに続くメロゾイトの遊出が観察された。
研究成果の発表	原著論文 [1] <u>Ehab Mossaad</u>, <u>Masahito Asada</u>, Daichi Nakatani, Noboru Inoue, Naoaki Yokoyama, <u>Osamu Kaneko</u>, <u>Shin-ichiro Kawazu</u>: Calcium ions are involved in egress of <i>Babesia bovis</i> merozoites from bovine erythrocytes. J Vet Med Sci. 2015 Jan; 77(1):53-8. 学会発表 [1] <u>麻田正仁</u>、<u>矢幡一英</u>、Hassan Hakimi、横山直明、五十嵐郁男、<u>金子修</u>、Carlos Suarez、<u>河津信一郎</u>：バベシア原虫における遺伝子改変技術の開発 第 12 回分子寄生虫学マラリア研究フォーラム合同大会、2014 年 9 月、帯広 [2] <u>Ehab Mossaad</u>, <u>Masahito Asada</u>, Daichi Nakatani, Noboru Inoue, Naoaki Yokoyama, <u>Osamu Kaneko</u> and <u>Shin-ichiro Kawazu</u>: Calcium ions are involved in egress of <i>Babesia bovis</i> merozoites from bovine erythrocytes. 第 60 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2014 年 10 月、盛岡