博士（獣医学）　WICKRAMASEKARA RAJAPAKSHAGE BANDULA KUMARA

学位論文題名

A study on mitochondrial genome and the glycolysis pathway of diminazene aceturate-resistant *Babesia gibsoni* isolate *in vitro*

（体外培養ジミナゼン耐性*Babesia gibsoni*株のミトコンドリア遺伝子ならびに解糖系に関する研究）

学位論文内容の要旨

Babesia gibsoniは犬に感染する血液原虫であり、犬バベシア症を引き起こす。犬バベシア症の治療においては、しばしば再発がみられることと、ジミナゼン・アセチュレート（diminazene aceturate; DA）などのバベシア症治療薬に対する薬剤耐性原虫の出現が問題となっている。トリパノソーマなどの他の血液原虫における薬剤耐性に関する研究において、耐性獲得にミトコンドリアや解糖系の変化が関与していることが報告されているが、*B. gibsoni*の薬剤耐性獲得機序については報告がない。そこで本研究では、DA耐性*B. gibsoni*株の耐性機序を解明することを目的として、*in vitro*にて作製したDA耐性*B. gibsoni*株を用い、ミトコンドリア遺伝子ならびに解糖系に着目して、DA耐性*B. gibsoni*株について分析を行い、野生株と比較検討した。

第1章では、DA耐性*B. gibsoni*株のミトコンドリア遺伝子について解析した。まず、DA耐性の性質の安定性を観察するために、DA耐性株を4週間、DAを含まない培養液で培養し、その後再度200 ng/mlのDAを含む培養液で2週間培養した。その結果、この株はDAへの再暴露後にもDA耐性株と同様に増殖したことから、DA耐性の性質は失われずDA耐性株において安定して維持されることが明らかになった。このことから、DA耐性株においては何らかの遺伝子が野生

株とは変化していることが疑われた。このため、DA耐性獲得により変化する遺伝子の候補として、本研究ではシトクロームcオキシダーゼ・サブユニットI（COXI）、シトクロームcオキシダーゼ・サブユニットIII （COXIII）およびシトクロームb （CYTb）のミトコンドリア遺伝子について解析を行った。DA耐性株ならびに野生株の*B. gibsoni*からミトコンドリアDNAをクローニングし、その全長の塩基配列を解析することでミトコンドリアDNA上に存在するCOXI、COXIII、およびCYTb遺伝子の塩基配列を決定した。それらの塩基配列と予想されるアミノ酸配列をDA耐性株と野生株との間で比較したが明らかな差が無かった。次に、DA耐性株ならびに野生株の*B. gibsoni*からmRNAを抽出、cDNAを合成し、半定量PCR法を用いてCOXI、COXIII、およびCYTb遺伝子の遺伝子転写量を比較したところ、明らかな差はなかった。以上のことから、DAはCOXI、COXIII、およびCYTb遺伝子の塩基配列や遺伝子転写量に直接的に変化を引き起こさず、ミトコンドリア遺伝子は*B. gibsoni*のDA耐性獲得において中心的な役割は担っていないことが明らかになった。

第2章では、DA耐性株のエネルギー産生量とエネルギー産生の場としての解糖系の解析を行った。これは、培養におけるDA耐性株の原虫寄生率が、野生株に比べて常に低いことから、DA耐性株の増殖力は野生株よりも低く、その一因としてエネルギー産生量が野生株よりも低下していると予測し、研究を行った。本研究では培養にて増殖したDA耐性株ならびに野生株の*B. gibsoni*を回収して原虫溶解液を作製し、溶解液中の酵素活性ならびに代謝産物濃度を分光光度計を用いて測定した。その結果、予想とは逆にDA耐性株の細胞内ATP濃度ならびにグルコース濃度は野生株よりも明らかに高いことが示された。いくつかの血液原虫における薬剤耐性に関する研究において、原虫が薬剤耐性の性質を維持するためにより多くのエネルギーを利用していることが報告されていることから、DA耐性*B. gibsoni*株においてもそのDA耐性の性質を維持するた

めに、より多くのATP、すなわちエネルギーを必要としている可能性や、DA耐性株は増殖が低下していることから、むしろATPの消費が低下している可能性も考えられた。DA耐性株において細胞内ATP濃度が高い原因を解明するために、バベシア原虫において最も重要なエネルギー産生の場として考えられている解糖系の活性について、さらに検討を行った。まず、解糖系の律速酵素である乳酸デヒドロゲナーゼ活性と、最終代謝産物である乳酸濃度に変化はなく、DA耐性株の解糖系の活性は変化していないことが示された。さらに、ピルビン酸キナーゼ活性と、TCAサイクルなどでも利用される重要な中間代謝物であるピルビン酸濃度についても変化が無かった。さらに第1章において、ミトコンドリアに存在するCOXI、COXIII、およびCYTbの遺伝子転写量の明らかな変化は認められなかったことから、DA耐性株では細胞内ATP濃度が上昇しているが解糖系やTCAサイクルなどの代謝は活性化していないことが示唆された。

本研究では、*B. gibsoni*のDA耐性獲得において、ミトコンドリア遺伝子は直接的には関与しないことが示された。また、DA耐性株のエネルギー濃度は増加しているにもかかわらず、解糖系は活性化していないことも示された。今回の研究では、DA耐性株におけるミトコンドリア等の酵素活性の変化は検討していないことから、今後はDA耐性*B. gibsoni*株のミトコンドリアを中心として、その代謝活性の研究を行うことで、ATP濃度が上昇している原因が明らかになると期待される。これらの研究を通じて、DA耐性*B. gibsoni*株の耐性機序が明らかになるであろう。

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　滝　口　満　喜
副　査　　教　授　　片　倉　　賢
副　査　　教　授　　大　橋　和　彦
副　査　　准教授　　山　﨑　真　大

学 位 論 文 題 名

A study on mitochondrial genome and the glycolysis pathway of diminazene aceturate-resistant *Babesia gibsoni* isolate *in vitro*

（体外培養ジミナゼン耐性*Babesia gibsoni*株のミトコンドリア遺伝子ならびに解糖系に関する研究）

Babesia gibsoni が引き起こす犬バベシア症では、ジミナゼン・アセチュレート（diminazene aceturate; DA）などの治療薬に対する薬剤耐性原虫の出現が問題となっている。トリパノソーマなどの他の血液原虫における薬剤耐性に関する研究において、耐性獲得にミトコンドリアや解糖系の変化が関与していることが報告されているが、*B. gibsoni* の薬剤耐性獲得機序については報告がない。そこで本研究では、DA 耐性 *B. gibsoni* 株の耐性機序を解明することを目的として、ミトコンドリア遺伝子ならびに解糖系に着目して、DA 耐性 *B. gibsoni* 株について *in vitro* にて分析を行い、野生株と比較検討した。

はじめに、DA 耐性 *B. gibsoni* 株のミトコンドリア遺伝子について解析した。まず、DA 耐性の性質の安定性を観察するために、DA 耐性株を 4 週間、DA を含まない培養液で培養し、その後再度 200 ng/ml の DA を含む培養液で 2 週間培養した。その結果、この株は DA への再暴露後にも DA 耐性株と同様に増殖したことから、DA 耐性の性質は失われず DA 耐性株において安定して維持されることが明らかになった。このことから、DA 耐性株においては何らかの遺伝子が変化していることが疑われた。このため、DA 耐性獲得により変化する遺伝子の候補として、シトクロームｃオキシダーゼ・サブユニットⅠ（*COXI*）、シトクロームｃオキシダーゼ・サブユニットⅢ（*COXIII*）、およびシトクロームｂ（*CYTb*）のミトコンドリア遺伝子について解析を行った。*B. gibsoni* からミトコンドリア DNA をクローニングし、ミトコンドリア DNA 上に存在する *COXI*、*COXIII*、および *CYTb* 遺伝子の塩基配列を決定した。それらの塩基配列と予想されるアミノ酸配列を DA 耐性株と野生株との間で比較したが、明らかな差は認められなかった。

続いて、DA 耐性株ならびに野生株の *B. gibsoni* の *COXI*、*COXIII*、および *CYTb* 遺伝子の発現量を比較したところ、明らかな差はなかった。以上のことから、DA は *COXI*、*COXIII*、および *CYTb* 遺伝子の塩基配列や発現量に直接的に変化を引き起こさず、ミトコンドリア遺伝子は *B. gibsoni* の DA 耐性獲得において中心的な役割は担っていないことが明らかになった。

次に、DA 耐性株のエネルギー産生量とエネルギー合成系としての解糖系の解析を行った。これは、培養における DA 耐性株の原虫寄生率が野生株に比べて常に低いことから、DA 耐性株の増殖力は野生株よりも低く、その一因としてエネルギー産生量が野生株よりも低下していると予測し、研究を行った。本研究では *B. gibsoni* の酵素活性ならびに代謝産物濃度を分光光度計を用いて測定した。その結果、予想とは逆に DA 耐性株の細胞内 ATP 濃度ならびにグルコース濃度は野生株よりも明らかに高いことが示された。いくつかの血液原虫における薬剤耐性に関する研究において、原虫が薬剤耐性の性質を維持するためにより多くのエネルギーを利用していることが報告されていることから、DA 耐性 *B. gibsoni* 株においても、その DA 耐性の性質を維持するためにより多くの ATP、すなわちエネルギーを必要としている可能性や、DA 耐性株は増殖が低下していることから、むしろ ATP の消費が低下している可能性も考えられた。さらに、バベシア原虫において最も重要なエネルギー合成系として考えられている解糖系の活性について検討を行った。解糖系の律速酵素である乳酸デヒドロゲナーゼ活性と、代謝産物である乳酸濃度に変化はなく、DA 耐性株の解糖系の活性は変化していないことが示された。また、ピルビン酸キナーゼ活性と、重要な代謝産物であるピルビン酸濃度についても変化が無かった。上述のとおり、ミトコンドリアに存在する *COXI*、*COXIII*、および *CYTb* 遺伝子の発現量の明らかな変化は認められなかったことから、DA 耐性株では細胞内 ATP 濃度が上昇しているが解糖系や TCA サイクルなどの代謝は活性化していないことが示唆された。

本研究により、*B. gibsoni* の DA 耐性獲得において、ミトコンドリア遺伝子は直接的には関与しないことが明らかになった。また、DA 耐性株のエネルギー濃度は増加しているにもかかわらず、解糖系は活性化していないことも示された。これらの知見は、今後 *B. gibsoni* における DA 耐性機序を解明する上で重要であると考えられる。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者　ヴィックラマセカラ　ラジャパシャゲイ　バンデューラ　クマラ氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。