

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03919

研究課題名(和文) マダニ吸血プロセスにおけるロンギスタチンの分泌意義と疾患制御への応用

研究課題名(英文) Longistatin secretion in tick feeding process and its application to disease control

研究代表者

八田 岳士 (Hatta, Takeshi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00455304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、感染症伝播において、蚊に次ぐ重要な節足動物であるフタトゲチマダニの唾液分子等生物活性分子を対象としており、その分泌の生物学的な意義について解明を図った研究である。最新鋭のDNA配列解析装置である次世代シーケンサーを駆使し、ロンギスタチン等マダニの機能分子の発現制御に関与するプロモーター領域の配列解明を行い、特に転写活性が強い翻訳伸長因子プロモーター配列領域の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症熱性血小板減少症候群ウイルスのベクターとされるフタトゲチマダニでは、未だ培養細胞や遺伝子解析のためのツールが少ない。今回解読に成功した翻訳伸長因子プロモーター配列領域は、例えばゲノム編集に必須のCas9蛋白質をマダニ体内にて独自に発現させることが期待される等、外来遺伝子の発現に用いることが期待でき、将来的にはマダニ研究ツールの基盤エレメントとなることが予想され、学術的にも社会的にもインパクトの大きい成果である。

研究成果の概要(英文)：This study is focusing on the biologically active molecules such as salivary molecules of *Haemaphysalis longicornis* tick which can transmit many kinds of the infectious disease to human and animals. In particular, we attempted to elucidate the biological significance related to the secretion of those bioactive molecules. Using a next-generation sequencer, we have elucidated the sequence of the promoter region involved in the expression control of functional molecules of ticks such as longistatin, and succeeded in identifying the translation elongation factor promoter sequence region with a particularly strong transcription activity.

研究分野：分子ベクター学

キーワード：フタトゲチマダニ ロンギスタチン アクチン 翻訳伸長因子 プロモーター配列 レポーターアッセイ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マダニ吸血の特徴は、長時間にわたる宿主血液の大量搾取である。吸血様式として、比較対照とされやすい蚊は口器を直接皮下の血管に挿入する血管内吸血型 (Vessel feeder) であるが、マダニは皮下の血管を破綻させ、真皮に血液を溜める Blood pool を形成し、ここから血液を搾取する血管外吸血型 (Pool feeder) である。外部寄生虫として宿主体表に付着後、固着に必要なセメント様物質などを唾液腺から分泌し、その後は抗止血物質などを宿主内に放出しながら、宿主血液を中腸内に取り込み、飽血に至るまで宿主体表に寄生する。産卵を控える成ダニ期であれば、約1週間にわたって吸血を続ける(図1)。マクロで確認できる吸血プロセスの背後には、生き血確保に向けて宿主動物との間に分子間でのダイナミックなせめぎ合い



図1 成ダニ期マダニの吸血プロセス

未吸血時から飽血時までの個体変化(左)及び体重変化(右)

があることが分かってきた。近年整備されたゲノムデータベース、特定の遺伝子発現を阻害したノックダウン (Kd) マダニ、吸血プロセスを宿主動物を用いずに再現できる人工吸血実験法などの新たな解析技法を用いることで、宿主動物にはない生理活性物質の特異機能が明らかになってきた。

2. 研究の目的

ロンギスタチンの活性化機構の解明を目指し、マダニ唾液腺におけるロンギスタチン産生の発端となる情報伝達系と受容体・リガンドの特異性を明らかにし、ロンギスタチンの分泌・組織浸潤機構の解明を目指して、唾液腺管から Blood pool への分泌機構を局在追跡から、時間空間的な分子挙動を明らかにすることは重要である。また、宿主生体防御及び媒介病原体に対するロンギスタチン作用機構の解明を通して、RAGE を介して展開されるサイトカインなどマウスの自然免疫系エフェクターに対する相互作用と、マダニ媒介性バベシア原虫に対する分化・増殖作用を明らかにする必要もある。一方、ロンギスタチンによる抗炎症惹起・制御機構には未解明の部分が多く、マウス体内でおこる RAGE 介在性炎症の発生を抑制する分子機構については全く分かっていない。ロンギスタチンを用いた疾患予防治療薬及び疾患モデルの開発のためには、ロンギスタチン合成ペプチドがマダニワクチンや抗アレルギー剤としての活用できることを検証する必要があり、同時に動物・ヒト疾患制御に対する予防・治療薬としての可能性を明らかにすることも重要となる。そこで本研究は、ロンギスタチンを含む唾液生理活性物質発現を調節する転写因子や、その転写活性化機構に着目した研究を行うこととした。

3. 研究の方法

(マダニ)未吸血(吸血後0日目)の成ダニから唾液腺を解剖顕微鏡下で回収し、全 RNA を抽出した。同様に吸血後2日目(slow feeding)と4日目(rapid feeding)のサンプルについても全 RNA を抽出した。

(トランスクリプトーム解析)4Gb スケールでの illumina Hiseq2000 プラットフォームにより、RNAseq 解析を行った。また、これまでに構築した唾液腺 cDNA ライブラリーのランダムシーケンス解析により得られた平均約 500bp 程度のワンパスシーケンスにより得られた、発現配列タグデータベース Expression Sequence Tag database を用いた in silico 解析も同時に行った。

(プロモータークロニング)mRNA の配列をもとに、転写開始領域を検出、ついで、遺伝子配列内に相補鎖プライマーを複数作成し、ゲノム DNA を鋳型として、転写開始点の上流にある遺伝子領域についてクロニングを行った。

(レポーターアッセイ)クロニングに成功したアクチンおよび翻訳伸長因子 遺伝子上流のプロモーター領域について、ルシフェラーゼ Luc をベースとした哺乳類細胞発現ベクターの Luc 遺伝子上流に挿入し、レポーターベクターを構築した。得られたレポーターベクターをマダニ細胞株に導入し、ルシフェラーゼの活性を測定することにより、得られたプロモーターの転写活性を測定した。

4. 研究成果

(2017 年度)ロンギスタチンを含む唾液生理活性物質発現を調節する転写因子を明らかにすることを目標とし、その遺伝子同定を中心に行った。フタトゲチマダニ単為生殖系岡山株を用い、未吸血(吸血後0日目)の成ダニから唾液腺を解剖顕微鏡下で回収し、全 RNA を抽出した。同様の操作を、吸血後2日目(slow feeding)と4日目(rapid feeding)のサンプルを用いて行い、各ステージの全 RNA 抽出を行った。各々4Gb スケールでの illumina Hiseq2000 による RNAseq 解析を行った。得られた配列より転写因子の探索を行ったところ、唾液腺での生理活性物質発現を調節する転写因子として、低酸素応答因子である HIF (hypoxia inducible factor) -1 との遺伝子全長の解読に成功した。唾液腺に HIF が発現する生物学的意義について更なる検証が必要である。今回の解析では、正常酸素濃度条件において、いずれも HIF 転写活性の抑制に参画す

る分子として HIF-1 のプロリン残基水酸化に關与する hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (HIF-PHD)、アスパラギン残基水酸化に關与する factor inhibiting HIF1 (FIH-1)、ユビキチン結合に關与する von hippel-lindau tumor suppressor (pVHL)をコードする遺伝子についても同定に成功しており、逆に HIF の転写活性増強に係る transcription co-activator である E1A/CREB-binding protein 様の遺伝子についても同定することができた。これらは、HIF-PHD axis の全容解明から唾液分子の発現に係る起因事象を科学的に証明しうる基盤情報となる。

各吸血ステージ（未吸血期、緩慢吸血期、迅速吸血期）の唾液腺に発現する遺伝子について RNAseq による全配列の解明と、バイオインフォマティクスを利用したアノテーションを付与するためのトランスクリプトーム解析までを終えることができた。大規模遺伝子配列解析の結果、発現レベルとしてはレアな転写因子抑制因子についても同定することができており、また緑色蛍光発現バベシア原虫についても作製に成功している。

（2018 年度）ロンギスタチンを含む唾液生理活性物質発現を調節する転写調節領域、特にプロモーターについて明らかにすることを目標とし、その配列同定と機能性についての確認を中心に行った。フタトゲチマダニ単為生殖系岡山株を用い、未吸血（吸血後 0 日目）の成ダニから全 DNA を抽出した。これまでに EST 解析や NGS 解析を通して明らかとなった mRNA の配列をもとに、転写開始領域を検出、ついで、遺伝子配列内に相補鎖プライマーを複数作成した。ゲノム DNA を鋳型として、転写開始点の上流にある遺伝子領域についてクローニングを行ったところ、唾液腺を含む各臓器において発現量の高いアクチン遺伝子についての上流配列を得ることに成功した。特にアクチンプロモーター配列は、マダニの細胞内においてもプロモーター活性を有することを確認しており、また哺乳類 PGK プロモーター配列についてもマダニ細胞内でのプロモーター活性を有することを明らかとした。

（最終年度）これまでに EST 解析や NGS 解析を通して明らかとなった mRNA の配列情報とその発現量をもとに、既知のプロモーターと同様転写活性の高い遺伝子に着目をし、アクチンについてのプロモーターを獲得することに成功した。そこでロンギスタチンのプロモーター配列の取得を試みたが GC 含量が多いことが起因しクローニングには至らなかった。さらにゲノム DNA を新たに鋳型として、唾液腺を含む各臓器において発現量の高い翻訳伸長因子の遺伝子についても上流配列を約 3 kb 得ることに成功した。この翻訳伸長因子プロモーター配列は、マダニ培養細胞内を用いたレポーターアッセイにより活性を確認し、特に転写開始点上流 1 Kb で活性が最も高かった。これはマダニ細胞内で活性を有する哺乳類 PGK プロモーターよりも有意に高い活性を示していた。本配列の同定は、これまで off-target 効果が懸念されつつも RNAi に依存してきた逆遺伝学的手法を見直し、CRISPR-Cas9 によるノックアウト技術の確立へと結びつき、期間内では明らかにすることができなかつたロンギスタチンの生理学的意義についてより詳細に検討を加えることが可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Umemiya-Shirafuji R, Hatta T, Okubo K, Sato M, Maeda H, Kume A, Yokoyama N, Igarashi I, Tsuji N, Fujisaki K, Inoue N, Suzuki H.	4. 巻 63
2. 論文標題 Transovarial persistence of Babesia ovata DNA in a hard tick, Haemaphysalis longicornis, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Parasitol.	6. 最初と最後の頁 433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/ap-2018-0051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hernandez EP, Kusakisako K, Talactac MR, Galay RL, Hatta T, Fujisaki K, Tsuji N, Tanaka T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Glutathione S-transferases play a role in the detoxification of flumethrin and chlorpyrifos in Haemaphysalis longicornis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasit Vectors.	6. 最初と最後の頁 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-018-3044-9	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 該当する
1. 著者名 Matsubayashi M, Inaoka DK, Komatsuya K, Hatta T, Kawahara F, Sakamoto K, Hikosaka K, Yamagishi J, Sasai K, Shiba T, Harada S, Tsuji N, Kita K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Characteristics of Mitochondrial Electron Transport Chain from Eimeria tenella	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes10010029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hernandez Emmanuel Pacia, Kusakisako Kodai, Talactac Melbourne Rio, Galay Remil Linggatong, Hatta Takeshi, Matsuo Tomohide, Fujisaki Kozo, Tsuji Naotoshi, Tanaka Tetsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization and expression analysis of a newly identified glutathione S-transferase of the hard tick Haemaphysalis longicornis during blood-feeding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-018-2667-1	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 Matsubayashi Makoto, Matsuura Yuu, Nukata Satoko, Daizi Yuusuke, Shibahara Tomoyuki, Teramoto Isao, Matsuo Tomohide, Uni Shigehiko, Hatta Takeshi, Kaneko Akira, Tsuji Naotoshi, Sasai Kazumi	4. 巻 117
2. 論文標題 First detection and molecular identification of Entamoeba bovis from Japanese cattle	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 339 ~ 342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00436-017-5689-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umemiya-Shirafuji Rika, Hatta Takeshi, Okubo Kazuhiro, Sato Moeko, Maeda Hiroki, Kume Aiko, Yokoyama Naoaki, Igarashi Ikuo, Tsuji Naotoshi, Fujisaki Kozo, Inoue Noboru, Suzuki Hiroshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Transovarial persistence of Babesia ovata DNA in a hard tick, Haemaphysalis longicornis, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Parasitologica	6. 最初と最後の頁 836-841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/ap-2017-0100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato M, Hatta T, Maeda H, Tsubokawa D, Alim MA, Tsuji N, Inoue N, Suzuki H, Umemiya-Shirafuji R.	4. 巻 27
2. 論文標題 Application of Percoll density gradient centrifugation for separation of Babesia ovatainfected erythrocytes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Protozool. Res.	6. 最初と最後の頁 8-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsubokawa Daigo, Ishiwata Kenji, Goso Yukinobu, Nakamura Takeshi, Hatta Takeshi, Ishihara Kazuhiko, Kanuka Hirotaka, Tsuji Naotoshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Interleukin-13/interleukin-4 receptor pathway is crucial for production of Sd a -sialomucin in mouse small intestinal mucosa by Nippostrongylus brasiliensis infection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 731 ~ 734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2017.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsubokawa Daigo, Hatta Takeshi, Kikuchi Taisei, Maeda Hiroki, Mikami Fusako, Alim M. Abdul, Maruyama Haruhiko, Tsuji Naotoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Venestatin, a Ca ++ -binding protein from the parasitic nematode <i>Strongyloides venezuelensis</i> , is involved in the larval migration process	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal for Parasitology	6. 最初と最後の頁 501 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijpara.2017.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Emmanuel Hernandez, 草木迫浩大、Melboune Talactac、Remil Galay、八田岳士、藤崎幸蔵、辻尚利、田仲哲也。
2. 発表標題 Haemaphysalis longicornis glutathione S-transferase (HIGST2) is vital in the detoxification of chlorpyrifos in larval ticks
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪川大悟、八田岳士、小泉頌歌、三上房子、辻尚利。
2. 発表標題 ベネスタチン遺伝子ノックダウン糞線虫を用いた感染実験の展開。
3. 学会等名 第26回分子寄生虫学ワークショップ・第16回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪川大悟、八田岳士、小泉頌歌、三上房子、山本靖彦、丸山治彦、辻尚利。
2. 発表標題 糞線虫の宿主体内移行における終末糖化産物受容体 (RAGE) の役割。
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 Emmanuel Hernandez, Kodai Kusakisako, Takeshi Hatta, Tetsuya Tanaka.
2. 発表標題 Characterization of an iron-inducible Haemaphysalis longicornis tick-derived promoter in an Ixodes scapularis derived tick cell line (ISE6).
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 前田 大輝、八田 岳士、坪川 大悟、三上 房子、松林 誠、三好 猛晴、白藤(梅宮) 梨可、河津 信一郎、五十嵐 郁男、望月 雅美、辻 尚利、田仲 哲也
2. 発表標題 マダニ - バベシア実験感染モデルの確立
3. 学会等名 第160回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takeshi Hatta, Hiroki Maeda, Daigo Tsubokawa, Fusako Mikami, M Abdul Alim, Makoto Matsubayashi, Rika Umemiya-Shirafuji, Ryo Nakao, Naotoshi Tsuji
2. 発表標題 Preliminary study on the development of a model for the complete lifecycle of Babesia ovata without the need for cattle host
3. 学会等名 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference & 1st Asia Pacific Rickettsia Conference (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究分担者	中尾 亮 (Nakao Ryo) (50633955)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	

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 分 担 者	白藤 梨可 (Shirafuji Rika) (00549909)	帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教 (10105)	