

令和元年6月21日現在

機関番号：10105

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06496

研究課題名（和文）ステージ特異的ヴェノム発現原虫によるベクター媒介性感染症の制御

研究課題名（英文）Vector-borne diseases control by vector stage-specific Venom expression in protozoan

研究代表者

白水 貴大（Shirozu, Takahiro）

帯広畜産大学・原虫病研究センター・特任研究員

研究者番号：80804608

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：マラリアなどのベクター媒介性感染症の予防にはベクターコントロールが最重要である。しかし近年、既存の殺虫剤の環境や人体への悪影響、殺虫剤耐性蚊の出現などの問題から新たなベクターコントロールの開発が望まれている。そこで本研究では、次世代の殺虫分子として注目されている殺昆虫天然毒「ヴェノム」の利用に着目し、ステージ特異的ヴェノム発現原虫によるベクター媒介性感染症の制御法を開発を目指した。解析の結果、蚊に対して強い毒性効果を示すヴェノムが同定され、作製したヴェノム発現原虫のベクターステージへの伝播能が確認された。本研究により、ヴェノム発現原虫による新規ベクターコントロール法が開発が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリアは蚊によって伝播されるベクター媒介性感染症の一つであり、未だ年間の死亡者数が約40万人以上を超える世界最大の感染症である。近年の殺虫剤耐性などの課題を克服する次世代の殺虫分子として、有毒生物由来の殺昆虫天然毒「ヴェノム」の利用が注目されているが、従来の殺虫剤散布のような使用法では多大なコストを要することが課題であった。本研究により、蚊に対して毒性作用の高いヴェノムが同定され、作製したヴェノム発現原虫はベクターステージへの伝播能を有することが示唆された。今後のさらなる研究により、ベクターステージ特異的ヴェノム発現マラリア原虫により蚊を殺傷する新規ベクターコントロール法が開発が期待された。

研究成果の概要（英文）：Vector control is most important for the prevention of vector-borne diseases such as malaria. However, insecticides have a lot of problems such as the adverse effects on the environment and human body and the emergence of the insecticide-resistant insects. From these backgrounds, the development of a new vector control method is desired. Focusing on the use of "Venom", which is insecticidal natural toxins attracting attention as next-generation insecticidal molecules, this study was aimed at the development of a new vector-borne diseases control strategy by vector stage-specific Venom expression in protozoan. As a result of Venom screening analysis, the Venom exhibiting the strong toxic effect on the mosquitoes was identified. Additionally, the transmission ability of the recombinant Venom-expressing protozoan was confirmed. These findings were expected to contribute the development of a new vector control method.

研究分野：寄生虫学

キーワード：ベクター マラリア ヴェノム ベクターコントロール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マラリアは蚊によって伝播されるベクター媒介性感染症の一つで、2016年のWHOによる報告では年間の死亡者数が約40万人以上とされており、その感染症対策が急務とされている。ベクター媒介性感染症の予防法は殺虫剤や殺虫剤処理した蚊帳などによるベクターコントロールが最重要である。しかし近年、既存の殺虫剤の環境や人体への悪影響、さらには殺虫剤耐性蚊の出現などの問題から新たなベクターコントロールの開発が望まれている。

近年、注目されている代替法として囮誘引法がある。これは、二酸化炭素・熱・においなどを吸血源として認識する蚊の習性を逆利用し、血液バッグや誘引動物を囮として吸血させることで間接的にヒトが吸血されるのを防ぐものである。この手法において、囮となる吸血源に殺虫成分を含有させることができれば、新規ベクターコントロール法の開発につながると予想される。

そこで、哺乳動物に対する安全性と環境負荷の低さから次世代の殺虫分子として注目されている殺昆虫天然毒「ヴェノム」の利用に着目した。ヴェノムは、ハチ・クモ・サソリ等の有毒生物由来のペプチドまたはタンパク質で構成されるため、既存の殺虫剤とは異なる作用機序による殺虫効果により、殺虫剤耐性の課題を克服することが可能であると期待される。ただし、ヴェノム分子の抽出・精製および化学合成には多大なコストを要することが課題とされる。

一方、感染には宿主・病原体という「宿主特異性」が存在する。マラリアを例にすると、マラリア原虫はヒトをはじめとする脊椎動物を中間宿主とし、ハマダラカのみを終宿主とする。このように、ある病原体は、ある種の宿主にのみしか寄生しえないという特徴がみられる。

以上の背景を踏まえて本研究では、この宿主特異性に着目し、ベクターステージ特異的にヴェノムを発現する組換えマラリア原虫を作製し、蚊に感染させることで、病原体自身が蚊を致死または伝播不能状態にすることが可能なのではないかとこの着想に至った。この宿主特異性を逆利用した方法では、従来の殺虫剤散布法と比べて、他の動物種や環境へ悪影響を及ぼすリスクが極めて低く、殺虫対象である生物種特異的にヴェノム効果を発揮させることができると予測される。

2. 研究の目的

先行研究において、蚊への毒性効果が報告されていたヴェノムでは、病原体に対する毒性効果もみられていた(Carter V *et al.*, 2013)。本研究で提唱する「ベクターステージ特異的ヴェノム発現性マラリア原虫による新規ベクターコントロール法」を実現するためには、病原体への悪影響がなるべく少なく、蚊特異的な毒性効果を示すヴェノム分子が望ましい。

そこで本研究では、まず、ヴェノムスクリーニング解析による蚊に対して特異的かつより毒性効果の強いヴェノム分子の同定を目指した。次に、実際にヴェノム発現マラリア原虫を作製し、蚊へ感染させることは可能であるかを立証し、ベクターステージ特異的ヴェノム発現原虫による新規ベクター媒介性感染症の制御という方法論の確立を目指した。

3. 研究の方法

ヴェノムスクリーニング解析

先行研究において蚊への毒性が示されている「Melittin」を陽性コントロールとし、新たに7種のヴェノム(Venom-A, B, C, D, E, F, G)を入手し、ヴェノムスクリーニング解析を行った。ハマダラカは、明暗=16:8、27の条件下で継代飼育されている *Anopheles stephensi* を用いた。実体顕微鏡下で二酸化炭素による麻酔で不動化したハマダラカの腹節基部に 50 μ M に調整したヴェノム溶液または陰性コントロールとして PBS(-) を約 130 nl の容量でインジェクションした(図1)。インジェクションにはガラスマイクロニードル電動インジェクターを用いた。インジェクション後、飼育用ケージに蚊を移動させ、麻酔覚醒を確認後、上記条件下で飼育した。インジェクション後7日間の蚊の生死数をモニタリングした。陰性コントロールと比べて生存率に有意な低下がみられたヴェノムについては、ヴェノム濃度を段階希釈(0.125 - 50 μ M)した解析を行い、50%致死量(LD₅₀)を算出した。



図1 マイクロインジェクション

ヴェノム遺伝子導入マラリア原虫の作製

本実験のマラリア感染実験には、ヒトへの感染能がなく比較的安全とされる齧歯類特異的マラリア原虫 *Plasmodium berghei* を用いた。で同定されたヴェノムについて遺伝子導入用ベクターを構築した。プロモーターにはベクターステージ特異的転写活性が見込まれるサーカムスポロゾイトを選定した。レポータータンパク質の GFP を発現する *Plasmodium berghei* ANKA 株を用いて構築したヴェノム導入ベクターのトランスフェクションを行った。PCRにより目的遺伝子の導入を確認後、限界希釈法による変異株のクローニングを行った。クローン

変異株は、Inverse PCR およびシーケンス解析により導入箇所を特定した。最後に、クローン変異株に感染したマウスのハマダラカへの吸血による感染実験を行い、変異株のベクターステージへの伝播能を解析した。

4. 研究成果

ヴェノムスクリーニング解析の結果、インジェクション後1日目から陽性コントロール「Melittin」に加え、3種のヴェノム(Venom-B, C, E)において蚊に対する有意な毒性効果が示された(図2)。LD₅₀を測定した結果、「Venom-B」はLD₅₀=4.95x10⁻⁶ mg/頭(7.12x10⁻¹³ mol)、「Melittin」はLD₅₀=1.03x10⁻⁵ mg/頭(3.6x10⁻¹² mol)であった。モル質量換算で計算すると、「Venom-B」は「Melittin」よりも毒性作用が約5倍強いことが示唆された(図3)。これより、蚊に対してより強い毒性効果を示すヴェノムが同定された。

次に、有意な毒性効果が示されたヴェノムについて遺伝子導入用ベクターを構築し、トランスフェクションにより組換えマラリア原虫を作製した。一部のヴェノムについて、クローン変異株の作製に成功した。クローン変異株のハマダラカへの感染実験の結果、ハマダラカにおいてGFP蛍光が確認されたことから、ヴェノム発現原虫はベクターステージへの伝播能を有することが示唆された(図4)。

本研究によって、蚊に対してより強い毒性効果を示すヴェノムが同定された。さらに、ヴェノム発現原虫により蚊を致死または伝播不能状態にする新規ベクターコントロール方法論は実現可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)
〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

白水 貴大、関 信彰、曾賀 晃、森下 雄貴、瀬藤 摩美、福本 晋也、「*Aedes aegypti* 系統における *Dirofilaria immitis* 感染初期宿主応答の比較解析」、第88回日本寄生虫学会大会、2019年3月15-16日、長崎大学、長崎県

白水 貴大、関 信彰、曾賀 晃、森下 雄貴、瀬藤 摩美、福本 晋也、「*Dirofilaria immitis* 抵抗性 *Aedes aegypti* 系統における感染阻害因子の同定」、第41回日本分子生物学会、2018年11月28-30日、パシフィコ横浜、神奈川県

白水 貴大、関 信彰、曾賀 晃、森下 雄貴、瀬藤 摩美、福本 晋也、「ネットアイシマカにおけるイヌフィラリア感染分子基盤の解析」、第64回日本寄生虫学会・衛生動物学会北日本支部合同大会、2018年10月13日、エミシア札幌、北海道

白水 貴大、関 信彰、曾賀 晃、森下 雄貴、瀬藤 摩美、福本 晋也、「*Aedes aegypti* 系統における *Dirofilaria immitis* 感染表現型の比較解析」、第161回日本獣医学会学術集会、2018年9月11-13日、つくば国際会議場、茨城県

Takahiro Shirozu, Nobuaki Seki, Akira Soga, Yuki Morishita, Mami Koketsu, and Shinya Fukumoto, 「The identification of *Aedes aegypti* strains of different vectorial capacity for *Dirofilaria immitis*」、ICOPA 2018 14th International Congress of Parasitology, Daegu, Korea, August 19-24, 2018

白水 貴大、関 信彰、曾賀 晃、森下 雄貴、瀬藤 摩美、福本 晋也、「ヤブカにおけるイヌフィラリア媒介能規定因子の解析」、第70回日本衛生動物学会大会、2018年5月11-13日、

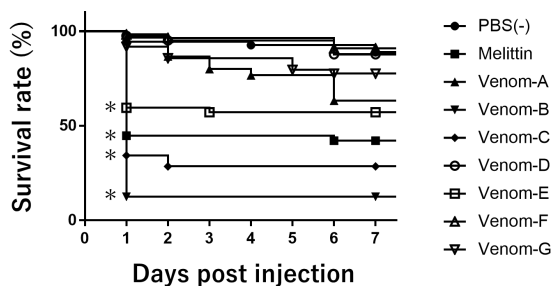


図2 ヴェノムインジェクション後のハマダラカ生存率
*: P<0.05

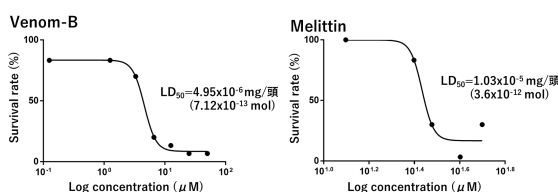
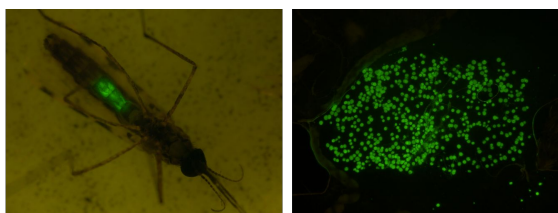


図3 Venom-BおよびMelittinにおけるLD₅₀



クローン変異株感染ハマダラカ クローン変異株感染中腸組織

図4 クローン変異株感染ハマダラカおよび中腸組織におけるGFP蛍光

帯広畜産大学、北海道

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし