

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19328

研究課題名(和文) 病原体伝播を阻止するマダニの遺伝子改変ドライブの開発

研究課題名(英文) Development of tick genetically modified drive to prevent pathogen transmission

研究代表者

田中 哲也(TANAKA, TETSUYA)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：00322842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマダニの感染防御に関わる遺伝子ノックアウト技術の確立を試み、これらを用いた感染症モデルを作製することを本研究の目的とした。マダニ体内でのウイルス免疫応答へのディフェンシンの関与を調べるため、ヘモリンフ由来(HE)ディフェンシンを用い、ウイルス増殖に及ぼす影響について検証した。作製したHEディフェンシンノックダウン・ノックアウトマダニにおいて、ランガットウイルスを体内接種したところ、マダニの生存並びに体内のウイルス増殖にほとんど影響を及ぼさなかった。従って、マダニ生体内では、抗微生物ペプチドのランガットウイルスに対する抗ウイルス免疫応答への関与の可能性が低いことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

[学術的意義] マダニの飼育には通常の研究室のような比較的小規模で、何百匹という単位での大規模感染実験が可能である。大量の個体に病原体を感染させられるということは、宿主側の遺伝子変異体を大量に用意することで、病原体に対する感染防御遺伝子の明確な解析を行うことが可能である。

[社会的意義] 哺乳類に比べ、個体そのものを扱った感染実験が容易である。従来のマウスやラットなどの哺乳類を扱った実験系では、1回の実験に経済的や物理的弊害が生じてしまうのが現実である。また、動物を用いた感染実験の倫理面も重視する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We attempted to establish a gene knockout technology related to the protection of ticks and aimed to create an infectious disease model using them. To investigate the involvement of defensins in the viral immune response in ticks, we used hemolymph-derived (HE) defensins and examined their effects on virus growth. When the Langat virus was inoculated in the produced HE defensin knockdown / knockout ticks in the body, it had little effect on the survival of the ticks and the virus multiplication in the body. Therefore, it was considered that the antimicrobial peptide is unlikely to be involved in the antiviral immune response to Langat virus in the body of the tick.

研究分野：マダニ遺伝子工学

キーワード：マダニ ノックダウン ノックアウト CRISPR/Cas9 トランスジェニック フェリチン グルタチオン Sトランスフェラーゼ ペルオキシレドキシン

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

#### (1) マダニが媒介する感染症の対策は世界的急務である

医薬技術の進歩や衛生環境の改善が劇的に進んだ現在においても、いまだ多くの感染症が世界中に蔓延している。感染性疾患を大別すると、インフルエンザなどのウイルス性感染症、出血性大腸菌 0-157 などの細菌性感染症、マラリアといった寄生虫による感染症に分類される。近年、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスやダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルスなどの、マダニが媒介する感染症が日本でも問題となっており、このような感染症には従来のワクチン療法では対応が後手となり、有効な対策が存在しない状況である。

#### (2) 病原体伝播を阻止する遺伝子改変マダニの確立は斬新な着想であり、卓越した成果が期待できる

これまで、マダニの目的遺伝子破壊において我々が用いてきた方法が RNA 干渉法である (Galay ら, InTech-Open Access Publisher, 2016)。マダニでの RNA 干渉法は簡便であり、かつ高効率に標的遺伝子の機能を低下させることが可能である。しかし、RNA 干渉法では、標的 mRNA を完全に分解することができず、ある一定の割合で遺伝子の機能が残存し、子孫に反映することができない。そのため、マダニにおいて、標的遺伝子を特異的に欠損させるノックアウトの技術や、標的外来遺伝子を特異的に挿入するノックインの技術の開発が望まれている。

#### (3) 遺伝子ターゲティングの動向

遺伝子ターゲティングは相同組換え修復を介して標的ゲノム領域に外来の遺伝子を挿入する技術で、マウスなど限られた生物の遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックインに利用されている。相同組換え効率が低い多くの生物では遺伝子ターゲティングを利用することが困難であるが、近年遺伝子のノックアウトやノックインに利用可能な CRISPR/Cas9 システムが開発された。CRISPR/Cas9 システムを用いることで、これまで遺伝子改変が困難であった培養細胞、動植物、蚊などの昆虫 (Kistler ら, Cell Rep, 2015) において標的遺伝子の欠損や変異挿入が可能となってきた。

#### (4) CRISPR/Cas9 とは?

CRISPR/Cas9 システムでは、ファージなどを介して外部から侵入してきた外来 DNA を断片化し、CRISPR 領域とよばれる内在のゲノム領域に取り込む。その後、取り込んだ DNA 配列を鋳型として短鎖の RNA (CRISPR RNA: crRNA) を合成し、tracrRNA (trans-crRNA) と呼ばれる 1 つの短鎖 RNA と組み合わせさせて、標的 DNA を認識して Cas ヌクレアーゼを呼び込み、切断する。現在 crRNA と tracrRNA をハイブリッドさせたキメラ RNA (gRNA) による革新的な CRISPR/Cas9 が、動植物や昆虫などのゲノム編集ツールとして利用されている。

我々はすでにリポフェクション法やエレクトロポレーション法によって、dsRNA やプラスミドをマダニ細胞に導入する技術を確立している。これらの技術を用いて、マダニ細胞やマダニのゲノム編集に CRISPR/Cas9 システムを活用することは、本研究の構想に有用であると考えた。

### 2. 研究の目的

#### 病原体伝播を阻止する遺伝子改変マダニの作製

マダニ媒介性感染症は新興・再興感染症を多く含むことから、全世界的に重要な位置付けがなされるようになってきた。我が国でも 2010 年以降、ウイルスによる SFTS やダニ媒介性脳炎に加え、リケッチャによる日本紅斑熱、細菌による新興回帰熱などのマダニ媒介による新興感染症が報告されている。これらウイルス、リケッチャ、細菌による感染患者数は年々増加傾向にある。このように、SFTS や日本紅斑熱による死亡例が毎年のように報告されているにもかかわらず、個々の病原体感染に有効なヒトの予防ワクチン開発などは、経済的対価が得られないなどの理由で開発が行われていない。

そこで本研究では、マダニの遺伝子改変技術を用いてウイルス増殖に関与するマダニの感染防御分子の同定を行い、「マダニの感染防御分子を破たんさせ、病原体を伝播させない」新たな感染症予防方法の開発を実施し、マダニ媒介による感染症リスク低減のための新しい技術開発を最終目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究はマダニ細胞や国内最優占種マダニで SFTS ウイルスや日本紅斑熱のベクターであるフタトゲチマダニを主要な実験材料として、マダニの血体腔、肛門、生殖腔接種によって、分子生物学的手法を取り入れながら実施された。

(1) 遺伝子ノックアウトマダニの作製を行うために、CRISPR/Cas9 システムで用いる病原体感染防御に関与するディフェンシン、スカベンジャーレセプター、アルゴノートに対応するガイド (g)RNA と Cas9 タンパク質を準備した。

(2) その後、gRNA と Cas9 タンパク質をマダニ細胞、卵、マダニへ、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、いずれかの方法によって導入を行い、マダニ細胞、卵、マダニの生存率を観察し、ノックアウトの状態を確認した。

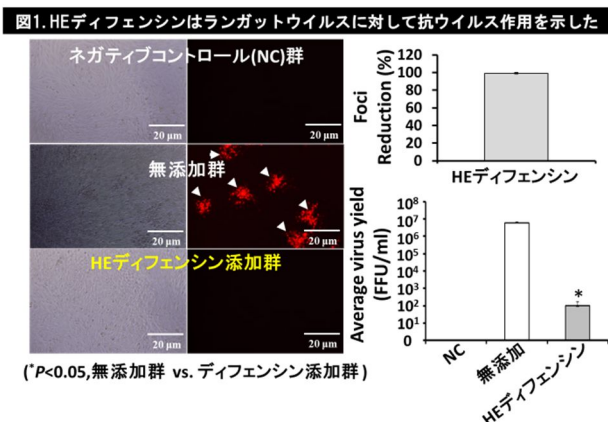
(3) 作製したノックアウトマダニ細胞やマダニにランガットウイルスなどの病原体を感染させた。その後、マダニ細胞やマダニの生存率を評価することによって、病原体に対する標的遺伝子の役割が明らかとなり、病原体伝播を阻止する遺伝子改変マダニの確立を目指した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ランガットウイルスに対するディフェンシンの影響

マダニ体内でのウイルス免疫応答へのディフェンシンの関与を調べるため、フタトゲチマダニ由来抗微生物ペプチドであるヘモリンフ由来(HE)ディフェンシンを用い、ランガットウイルス増殖に及ぼす影響について検証した。作製したHEディフェンシンノックダウン・ノックアウトマダニにおいて、ランガットウイルスを体内接種したところ、マダニの生存並びに体内のウイルス増殖にほとんど影響を及ぼさなかった。従って、マダニ生体内では、抗微生物ペプチドのランガットウイルスに対する抗ウイルス免疫応答への関与の可能性が低いことが考えられた。

一方、*in vitro*において、合成HEディフェンシンは、ランガットウイルスに対し、抗ウイルス活性を示した(図1)。以上の結果より、合成HEディフェンシンが、*in vitro*でのランガットウイルスに対する顕著な抗ウイルス活性を示したことから、マダニ媒介性病原体、特にフラビウイルスに対する新規の治療薬としての応用が期待された。



##### (2) マダニのゲノム編集技術の開発に向けて

我々は、すでにマイクロインジェクション法、リポフェクチン法、エレクトロポレーション法によって、dsRNA、プラスミド(*Venus* 遺伝子)、リボヌクレオタンパク質(sgRNA/Cas9 タンパク質複合体)をマダニやマダニ細胞に導入する技術を確認している。これらの技術を用いて、抗酸化分子であるペルオキシレドキシシンやグルタチオン S トランスフェラーゼの遺伝子減衰あるいは遺伝子過剰発現を行うことに成功した。また、ペルオキシレドキシシンを過剰発現する哺乳類細胞にランガットウイルスを感染させたところ、哺乳類細胞内のウイルス増殖が抑制される現象を見出した。

##### (3) 得られた研究成果と今後の展望

本研究では、ディフェンシン、スカベンジャーレセプター、アルゴノート遺伝子をノックダウンしたマダニを用いてランガットウイルスを体内接種したが、マダニの生存並びに体内のウイルス増殖にほとんど影響を及ぼさなかった。また、ディフェンシンノックアウトマダニを用いた実験でも同様の結果を示した。従って、スカベンジャーレセプターやアルゴノート遺伝子ノックアウトマダニにおいても同様な結果が得られる可能性がある。そのため、我々が同定したディフェンシンなどの抗微生物分子に加え、病原体感染後の酸化ストレスを担うペルオキシレドキシシンやグルタチオン S トランスフェラーゼなどの抗酸化分子が病原体を制御する可能性について着目し、研究を進めている。そこで今後は、抗微生物分子や抗酸化分子遺伝子をノックアウトしたマダニ系統を作製し、卵から成ダニまでの生活環を確立する。これらのマダニにランガットウイルスを感染させ、マダニ吸血によるマウスへのウイルス伝播阻止能を評価することで、感染防御における抗微生物分子や抗酸化分子の役割を明らかにする。最終的に、これらのノックアウトマダニの感染症モデルが病原体 宿主相互作用の解明に有効活用できることを目標とする。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kusakisako, K., Morokuma, H., Talactac, M. R., Hernandez, E. P., Yoshii, K. and Tanaka, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 A peroxiredoxin from the Haemaphysalis longicornis tick affects Langat virus replication in a hamster cell line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front. Cell. Infect. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.00007	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 -
1. 著者名 Hernandez, E. P., Kusakisako, K., Talactac, M. R., Hatta, T. and Tanaka, T.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Characterization of an iron-inducible Haemaphysalis longicornis tick-derived promoter in an Ixodes scapularis-derived tick cell line (ISE6)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasit. Vectors	6. 最初と最後の頁 321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13071-019-3574-9	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 -
1. 著者名 Talactac MR, Yoshii K, Hernandez EP, Kusakisako K, Galay RL, Fujisaki K, Mochizuki M, Tanaka T.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Vector competence of Haemaphysalis longicornis ticks for a Japanese isolate of the Thogoto virus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 9300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27483-1.	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 -
1. 著者名 Yada, Y., Talactac, M. R., Kusakisako, K., Hernandez, E. P., Galay, R. L., Andoh, M., Fujisaki, K., and Tanaka, T.	4. 巻 156
2. 論文標題 Hemolymph defensin from the hard tick Haemaphysalis longicornis attacks Gram-positive bacteria	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Invertebr. Pathol.	6. 最初と最後の頁 14-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jip.2018.07.005.	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, E. P., Kusakisako, K., Talactac, M. R., Galay, R. L., Yoshii, K. and Tanaka, T.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Induction of intracellular ferritin expression in embryo-derived Ixodes scapularis cell line (ISE6)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 16566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34860-3.	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 -

1. 著者名 Talactac, M. R., Hernandez, E. P., Fujisaki, K. and Tanaka, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 A continuing exploration of tick-virus interactions using various experimental viral infections of hard ticks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Physiol.	6. 最初と最後の頁 1728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2018.01728.	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 -

1. 著者名 Kusakisako, K., Ido, A., Masatani, T., Morokuma, H., Hernandez, E. P., Talactac, M. R., Yoshii, K. and Tanaka, T.	4. 巻 27 (5)
2. 論文標題 Transcriptional activities of two newly identified Haemaphysalis longicornis tick-derived promoter regions in the Ixodes scapularis tick cell line (ISE6)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Insect Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 590-602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imb.12497	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 Talactac, M. R., Yoshii, K., Hernandez, E. P., Kusakisako, K., Galay, R. L., Fujisaki, K., Mochizuki, M. and Tanaka, T.	4. 巻 9(7)
2. 論文標題 Synchronous Langat virus infection of Haemaphysalis longicornis using anal pore microinjection	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v9070189	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Emmanuel Pacia Hernandez, Kodai Kusakisako, Takeshi Hatta, Tetsuya Tanaka
2. 発表標題 Evaluation of an iron-inducible Haemaphysalis longicornis tick-derived promoter activity in an Ixodes scapularis-derived tick cell line
3. 学会等名 The 7th Sapporo Summer Symposium for One Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田仲哲也, 諸熊遥樹, 草木迫浩大, Emmanuel Pacia Hernandez
2. 発表標題 哺乳類細胞によるマダニアクチン遺伝子プロモータを用いた外来遺伝子の発現
3. 学会等名 第27回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emmanuel Pacia Hernandez, 草木迫浩大, 八田岳士, 田仲哲也
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 諸熊遥樹, 草木迫浩大, Melbourne Rio Talactac, Emmanuel Pacia Hernandez, 田仲哲也
2. 発表標題 フタトゲチマダニ由来抗酸化蛋白質を発現する哺乳類細胞の安定発現株の作製
3. 学会等名 第71回日本寄生虫学会南日本支部大会・第68回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田仲哲也, 井戸明子, 草木迫浩大, 諸熊遥樹, 正谷 達膳, Hernandez Emmanuel, Talactac Melbourne, 好井健太郎
2. 発表標題 マダニ胚由来細胞における遺伝子発現ベクターの探索
3. 学会等名 第26回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuya Tanaka, Yurika Yada, Melbourne Rio Talactac, Kodai Kusakisako, Emmauel Pacia Hernandez, Remil Linggatong Galay, Masako Andoh, Kozo Fujisaki
2. 発表標題 Antibacterial activity by hemolymph defensin from the hard tick <i>Haemaphysalis longicornis</i>
3. 学会等名 International Symposium in Veterinary Science: Strengthening the Regional Veterinary Education and Research for the Future Excellent Veterinary Graduates (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Talactac Rio, Kentaro Yoshii, Emmauel Hernandez Pacia, Remil Galay Linggatong, Kodai Kusakisako, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki, Tetsuya Tanaka
2. 発表標題 Evaluation of the vector competency of <i>Haemaphysalis longicornis</i> ticks in transmitting the Japan isolate Thogoto virus to mice
3. 学会等名 International Symposium in Veterinary Science: Strengthening the Regional Veterinary Education and Research for the Future Excellent Veterinary Graduates (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田仲哲也, 井戸明子, 草木迫浩大, 諸熊遥樹, 正谷 達膳, Hernandez Emmanuel, Talactac Melbourne, 好井健太郎
2. 発表標題 マダニ胚由来細胞における遺伝子発現ベクターの探索並びに構築
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 諸熊遥樹, 草木迫浩大, Emmanuel Pacia Hernandez, Melbourne Rio Talactac, 田仲哲也
2. 発表標題 哺乳類細胞におけるマダニアクチン遺伝子プロモーターを用いた外来遺伝子の発現
3. 学会等名 第70回日本寄生虫学会南日本支部大会・第67回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Melbourne Talactac, 好井健太郎, Emmauel Hernandez, 草木迫浩大, 藤崎幸蔵, 望月雅美, 田仲哲也
2. 発表標題 Evaluation of the vector competency of Haemaphysalis longicornis ticks in transmitting the Japan isolate Thogoto virus to mice
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Melbourne Talactac, 屋田友里花, 好井健太郎, Emmauel Hernandez, 草木迫浩大, 藤崎幸蔵, 望月雅美, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki, 田仲哲也
2. 発表標題 Characterization and antiviral activity of a newly identified defensin-like peptide, HEdensin, in the hard tick Haemaphysalis longicornis
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 Melbourne Rio Talactac, Kentaro Yoshii, Emmauel Pacia Hernandez, Kodai Kusakisako, Hiroki Maeda, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki, Tetsuya Tanaka
2. 発表標題 Experimental transmission of Japan isolate Thogoto virus by Haemaphysalis longicornis ticks
3. 学会等名 One Health 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference and 1st Asia Pacific Rickettsia Conference(TTP9-APRC1) (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Tetsuya Tanaka, Yurika Yada, Melbourne Rio Talactac, Kodai Kusakisako, Emmauel Pacia Hernandez, Hiroki Maeda, Remil Linggatong Galay, Masako Andoh, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki
2. 発表標題 The effect of bacteria by hemolymph defensin from the hard tick <i>Haemaphysalis longicornis</i>
3. 学会等名 One Health 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference and 1st Asia Pacific Rickettsia Conference(TTP9-APRC1) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Remil Linggatong Galay, Takeshi Miyata, Tetsuya Tanaka
2. 発表標題 Gene silencing in ticks through injection and immersion technique
3. 学会等名 9th PSP Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Melbourne Rio Talactac, Kentaro Yoshii, Emmauel Pacia Hernandez, Kodai Kusakisako, Hiroki Maeda, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki, Tetsuya Tanaka
2. 発表標題 Investigation of the survival dynamics of Japan isolate Thogoto virus in <i>Haemaphysalis longicornis</i>
3. 学会等名 International Symposium in Veterinary Science: Strengthening The Collaboration between Indonesian and Japanese Veterinary School (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学 共同獣医学部獣医学科 病態予防獣医学講座 感染症学分野  
<http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-Infection/sinkoukansen/index.html>

## 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
研究協力者	好井 健太郎  (Yoshii Kentaro)		