

研究種目：基盤研究（B）	
研究期間：2006-2009	
課題番号：18390130	
研究課題名（和文）	トランスジェニックカを用いたハマダラカマラリア原虫の寄生適応性の解明
研究課題名（英文）	Elucidation of parasitic adaptability between malaria parasite-anopheline mosquito using transgenic mosquitoes
研究代表者	
吉田 栄人（YOSHIDA SHIGETO）10296121	
自治医科大学・医学部・准教授	

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：マラリア、ハマダラカ、昆虫

1. 研究計画の概要

トランスジェニックハマダラカ作製技術を駆使し、ハマダラカマラリア原虫の寄生適応性を解明する。

2. 研究の進捗状況

(1) ナマコ由来のレクチン CEL-III を発現するトランスジェニックハマダラカを作製した。このトランスジェニックカは、著しくマラリア原虫の増殖を抑制し、伝搬阻止率が 91%に達した。さらにヒト熱帯熱マラリア原虫に対しても増殖阻止効果が確認された。今までに報告されているマラリア非媒介トランスジェニックの効果はネズミマラリアに限定されており、実際のマラリアベクターコントロールには新たなトランスジェニック作製が必要と考えられていた。CEL-III トランスジェニックは、すべてのヒトマラリア原虫株・種に有効であると予想され、CEL-III トランスジェニックはマラリアベクターコントロールとして大いに期待される。

(2) ハマダラカ唾液タンパク AAPP (Anopheles Anti-Platelet aggregation Protein)を同定した。AAPP はコラーゲン刺激血小板凝集を濃度依存的に強度に阻害した。AAPP のコラーゲン刺激血小板凝集メカニズムは、AAPP がコラーゲンに直接結合し、その結果コラーゲンが血小板へ接着することをブロックすることであった。さらにラットに AAPP を静脈内投与したところ、コラーゲン刺激の *ex vivo* 血小板凝集を投与量依存的に著しく抑制した。以上の結果より、AAPP はハマダラカの吸血行動において重要な役割を果たし

ていることが示唆されるだけでなく、新規抗血栓薬として開発できる可能性を有すると考えられる。

(3) ハマダラカ唾液タンパクの発現をコントロールするプロモーター領域を同定した。このプロモーターを用いて DsRed 遺伝子を連結し、トランスジェニックカを 2 種類（細胞内型、分泌型）作製した。細胞内型と分泌型は全く対照的な発現パターンを示し、分泌型は唾液腺 Duct に DsRed が蓄積されていた。蚊の唾液腺に外来遺伝子を発現、分泌することに成功した初めての報告であり、唾液腺マラリア原虫の相互作用の研究およびマラリア原虫を伝播しないハマダラカの作製等々の様々な研究が可能となる。特に側葉遠位部特異的に外来遺伝子を発現できたことは今後、マラリア原虫を含む病原体の唾液腺侵入機構解明に重要な手段となると期待される。さらに唾液腺に侵入した GFP マラリア原虫を 3D 共焦点顕微鏡でとらえることに成功した。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。計画通り下記の業績を上げている。

- (1) 世界で初の熱帯熱マラリア原虫の伝播を阻害するトランスジェニック蚊の作製に成功した（文献 3）。
- (2) ハマダラカ唾液タンパク中に血小板凝集阻害分子の同定に成功した（文献 2）。
- (3) 唾液腺特異的なプロモーターを同定し、世界で初めてハマダラカの唾液腺に外来遺伝子を発現することに成功した（文献 4）。

4. 今後の研究の推進方策

現在、唾液腺の他に唾液成分として外来タンパクを発現することに成功している。この方法を用いて唾液-マalaria原虫相互作用の解明を行う。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Yoshida S, Kawasaki M, Hariguchi N, Hirota K, Matsumoto M.: A Baculovirus Dual Expression System-based malaria vaccine induces strong protection against *Plasmodium berghei* sporozoite challenge in mice. *Infect Immun* 77:1782-9, 2009.
2. Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Enjou L, Matsuoka H.: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* 111:2007-14, 2008.
3. Yoshida S, Shimada Y, Kondoh D, Kouzuma Y, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Sinden RE.: Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Pathog* 3:1962-9, 2007.
4. Yoshida S & Watanabe H.: Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol Biol* 15:403-10, 2006.

[学会発表] (計 7 件)

1. Yoshida S & Watanabe H.: Establishment of robust salivary gland-specific expression in transgenic anopheline mosquito. XVII th International Congress for Tropical Medicine and Malaria (2008.9.30-10.3) Jeju, Korea.
2. 吉田栄人:「感染症征服のための新たな挑戦」トランスジェニック蚊を用いたマalariaコントロールに向けての新規戦略。平成 20 年度日本生化学会九州支部例会(2008.5.17-18.)博多
3. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いたハマ

ダラカーマalaria原虫の寄生適応性の解明 -マalariaコントロールに向けての新規戦略-。第 48 回日本熱帯医学学会特別講演 (2007.10.12-13) 大分。

4. Yoshida S.: Generation of genetically engineered mosquitoes refractory to malaria parasites -Challenge for malaria control through the genetic manipulation of its vector-. International Congress of Insect Biotechnology & Industry (2007.8.19-24.) Tegue, Korea.
5. Yoshida S, Sudo T, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H, Ishii A.: An inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. EMBO WORKSHOP 2007 "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors" (2007.7.13-20.) Crete, Greece.
6. 吉田栄人: 遺伝子操作蚊を用いた病原体-蚊の寄生適応性解明 -マalariaコントロールに向けての新規戦略-: 独立行政法人 農業生物資源研究所主催公開シンポジウム「昆虫科学研究の未来 - 昆虫を学ぶ、昆虫に学ぶ -」(2006.11.18.) 東京。
7. 吉田栄人: トランスジェニック蚊を用いたハマダラカーマalaria原虫の寄生適応性の解明。基盤研究(C) (企画研究調査) 「感染現象のマトリックス的解明をめざす企画調査研究」シンポジウム 感染現象のマトリックス (2006) 東京。

[図書] (計 1 件)

吉田栄人: マalaria防圧—遺伝子操作蚊からのアプローチ—(総説). *治療* 90:577-83, 2008.

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

国際特許PCT/JP2006/322417号
「Anti-Platelet Aggregation Product」(2006年)
Yoshida S, Sudo T.

[その他]

- (1) 吉田栄人「抗血栓薬 蚊の唾液から」日経新聞 2008年1月28日
- (2) 吉田栄人「21世紀の気鋭」日経新聞 2006年12月21日
- (3) 吉田栄人「蚊の遺伝子改変、マalaria防ぐ」日経新聞 2006年11月27日