

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05979

研究課題名(和文) マダニの家畜探索行動における分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular basis of tick host detection

研究代表者

山地 佳代子 (yamaji, kayoko)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40554275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マダニや蚊などの吸血性節足動物(ベクター)によって媒介される病原体由来の感染症は、人間や動物に対して大きな脅威となっている。これらベクターは、血液獲得を目的として宿主となる動物へ接近するアトラクション行動を呈するが、吸血後は、逆に宿主から積極的に逃避するリパルジョン行動を示す。本研究課題では優れた病原体媒介能をもつマダニに着目し、標的認識行動を制御するシステムの分子基盤の解明を試みることで、標的認識行動における複雑に制御された機序に迫る。このようなベクターに普遍的に備わった共通かつ必須の生存戦略である逃避行動を利用することで、全く新しいベクターコントロール法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マダニによる被害は、ヒトに限らず家畜にも甚大な被害を及ぼしており、医学・獣医畜産学両領域における共通の重要な課題である。

マダニの宿主への接近・付着行動については未解明なことが多い。マダニへの接近、宿主への付着を未然に防ぐことは、病原体媒介阻止に直結することから、申請者はマダニの宿主探索行動に焦点を当てることにした。得られる成果は、依然として困難が続くヒトや家畜におけるマダニ媒介性疾患の制圧において、安全性が高く、かつ持続的に実現しうる制圧技術の開発に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Tick-borne diseases present major public health issues worldwide. In ticks, the development of larvae and nymphs and the production of eggs by adults are all dependent on the acquisition of nutrients from the host blood-meal. Only one blood-meal is taken during each life stage and ticks can survive for several months after completion of feeding without requiring a further blood-meal. We investigated the molecular characterization of TRPA1 identified in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. The transient receptor was found to be expressed at highest levels in legs and chelicera of *H. longicornis*. Immunolocalization studies detected the endogenous TRPA1 in legs and chelicera of a larva tick. We will investigate the participation of TRPA1 molecules in host exploratory behavior by the behavior analysis system. We will investigate the participation of TRPA1 molecules in host exploratory behavior by the behavior analysis system.

研究分野：衛生動物学

キーワード：マダニ 吸血性節足動物 標的認識システム 衛生動物学 ハラー氏器官

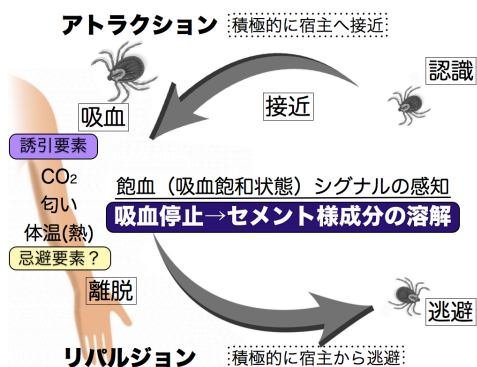
### 1. 研究開始当初の背景

マダニや蚊などの吸血性節足動物（ベクター）によって媒介される病原体由来の感染症は、人間や動物に対して大きな脅威となっている。これらベクターは、血液獲得を目的として宿主となる動物へ接近するアトラクション行動を呈するが、吸血後は、逆に宿主から積極的に逃避するリパルジョン行動を示す。本研究課題では優れた病原体媒介能をもつマダニに着目し、標的認識行動における複雑に制御された機序に迫った。このようなベクターに普遍的に備わった共通かつ必須の生存戦略である逃避行動を利用することで、全く新しいベクターコントロール法の開発が期待される。

### 2. 研究の目的

マダニや蚊などの吸血性節足動物は、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS)、マラリア、ライム病等の重篤な感染性疾患を起こす病原体を媒介する。これらの節足動物は、ベクターと称される。SFTS やデング熱など、国内でもベクターが関わる新興・再興感染症拡大の可能性が顕著化し、これらベクター感染症対策が急務である。しかし、現行の化学防除に依存した防御法は、薬剤耐性、環境汚染、人や動物への副作用などの問題が顕在化しており、安全で効果的・持続的に使用可能な防御法の開発に向けた多面的な研究を行っていくことは極めて重要である。

マダニや蚊などの吸血性節足動物は、宿主から放散される熱や匂い、二酸化炭素によって誘引され吸血を行う。宿主への誘引を人為的に操作できた際には、ヒトや動物への接近を抑制、すなわち病原体媒介を回避できることから、この標的認識の研究は蚊において積極的に進められてきた。このベクターにおける標的認識の研究は、これまでマラリア媒介蚊であるハマダラカ (*Anopheles gambiae*) がリードしてきた。中でも、アトラクション行動の研究は盛んであり、嗅覚受容体 (odorant receptor, Or) や温度感受性 TRP (Transient receptor potential) チャネルが中心となり標的認識を行っていることが報告されている。一方、飽血に 1-2 週間を要するマダニでは、より複合的な行動を誘起することで、飛翔能力を持たずとも正確無比な吸血行動が達成するが、その吸血行動を支える標的認識システムについてはほとんど知られていない。そこで本研究では、ウイルス・細菌・リケッチア・原虫・寄生虫と多様な病原体媒介スペクトラムを示し、かつ優れた媒介能を有するマダニに焦点をあて、宿主への接近から逃避の一連の吸血行動に着目することで、ベクター特異的に効果を発揮する新しい制御法につながる本研究を考案した。



### 3. 研究の方法

外部環境の温度感知は生物の生存に必須の機能であり、ヒトからショウジョウバエまで TRP (Transient receptor potential) チャネルを温度感知センサーの責任因子とした温度受容メカニズムは進化的にかなり保存されている。蚊やマダニなどの吸血性節足動物は、進化の過程で TRP チャネルのレパートリーと活性化温度閾値を変化させることで、標的となる宿主の熱を感知していると推測される。蚊では、触角や小顎髭、口吻などの付属肢に局在する TRP チャネルが宿主由来の熱の認識に重要な役割を果たしている。一方、飛翔能力をもたないマダニは、第一脚にあるハラー氏器官に「温度・湿度感覚を受容する感覚子」が局在しており、第一脚をアンテナの様に掲げることで宿主の位置を把握していると推測されているが、宿主認識を支える分子基盤は明らかになっていない。

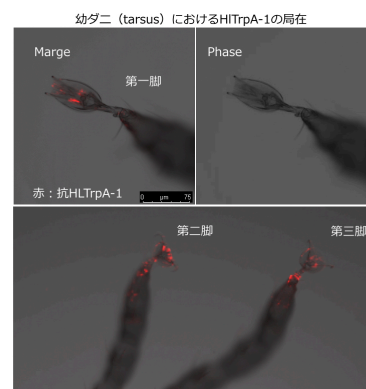
そこで本研究では、次世代シーケンス解析にて日本優占種であるフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) の成ダニで発現する遺伝子群の網羅的解析を行い、TrpA1 遺伝子や Gr (gustatory receptor)、IR (Ionotropic glutamate receptor) 遺伝子のホモログを同定した。H1TrpA1 (*Haemaphysalis longicornis* TrpA1: H1TrpA1, 3625bp) 遺伝子は、卵や産卵中の親ダニでは発現が認められないが、幼ダニから成ダニまでの発育ステージでは、第一脚を含む様々な組織で発現が認められた。そこで、H1TrpA1 のマダニ体内における局在を検討するため、H1TrpA1 の抗血清を作製した。H1TrpA1 cDNA より大腸菌組換え H1TrpA1 を作製・精製後、マウス 5 匹に免疫を行うことで高い抗体価・精製率が得られた抗血清のみを使用した。paraformaldehyde にて固定したマダニを用いて、H1TrpA1 抗血清とインキュベートを行い、Goat Anti-mouse IgG (Alexa Fluor 555) とインキュベート後、LEICA SP8 FALCON にてマダニ体内における局在を可

視化した。

次に宿主が放散する要素の一つである二酸化炭素認識システムの解明を目指し、行動解析用システムを用いて、マダニの二酸化炭素刺激に対する応答を精査した。マダニは吸血に適した動物を見つけるため、僅かな二酸化炭素濃度の変化に常に警戒しながら、第一脚にあるハラー氏器官を掲げて草むらで数ヶ月に渡り待機する。このハラー氏器官は乾燥や外部からのダメージを防ぐためにカプセルで覆われており、カプセル内に局在する 2 つの嗅覚感受子が、僅か 10ppm の変化も感受する二酸化炭素認識責任器官であると推測されている。しかし、二酸化炭素受容体を始めとした二酸化炭素認識を支える分子基盤や機序については全く不明である。そこで本研究では、まず始めに行動解析用システム：ダニオビジョン（株式会社ソフィア・サイエンティフィック）を用いてマダニの行動を録画し、それぞれの個体の運動量・速度・蛇行性など様々なパラメーターによる行動解析をマダニ各発育ステージにおいて実施した。またダニオビジョンに二酸化炭素の継示的パルス放散システムを独自に付加し、二酸化炭素刺激に対する行動観察を自動計測できるよう改良することで、マダニの活動量・活動域の定量化を試みた。さらに、マダニの標的認識行動において重要である二酸化炭素認識行動の分子基盤を解明するため、二酸化炭素感受性マダニと、二酸化炭素非感受性マダニを用いて、発現する遺伝子群のトランスクリプトーム比較により標的認識システムに関与する分子群の探索を行った。

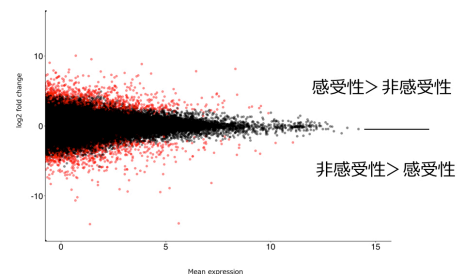
#### 4. 研究成果

本研究では、フタトゲチマダニ成ダニのトランスクリプトーム解析により、既に蚊において宿主認識への関与が示唆されている Gr、Ir、TrpA1 遺伝子等のホモログを単離することに成功した。特に本研究では、蚊の熱受容に重要とされている TrpA1 のホモログに注目し、HlTrpA-1 に対する抗血清を作製することでマダニ体内における局在を可視化した。HlTrpA1 は、マダニの中腸や唾液腺では認められなかったが、吸血時に宿主皮膚と接触する第一脚から四脚での局在が推測された（右図）。今後、TrpA1 を中心に TRP チャネルの熱受容への評価と機能解析を加えることで、マダニ温度認識システムが明らかになると考えられる。



次に二酸化炭素認識システムの解明を目指し、マダニ発育ステージ（幼ダニ、若ダニ、成ダニ）における二酸化炭素刺激への応答を精査した。どのステージとも、二酸化炭素 2500ppm を行動解析用システムに放散した 10 分間後、運動量は著しく増加した。さらに、若ダニでは吸血終了直後も二酸化炭素刺激によって 10 分間の運動量が増加したことから、飽血直後も二酸化炭素認識を行なっている可能性が示唆された。また、マダニ二酸化炭素システムを支える分子基盤を明らかにするため、二酸化炭素感受性・非感受性フタトゲチマダニの遺伝子発現解析を実施した。行動解析用装置内にて 2500ppm の二酸化炭素放散を行うことで刺激を加え、二酸化炭素刺激 10 分後の運動量が増加した感受性マダニと、運動量に変化が認められなかった非感受性マダニそれぞれから RNA を抽出後、RNAseq 解析をすることで遺伝子発現量に差が認められる分子群の探索を実施した。その結果、二酸化炭素感受性マダニで二酸化炭素刺激直後に複数の候補分子（cathpsin B、heat shock protein、TNF receptor associated factor など）の変動が認められた（右図）ことから、今後の分子の機能解析を行うことで、マダニ二酸化炭素認識のシステムが明らかになると考えられる。

二酸化炭素非感受性・感受性マダニのトランスクリプトーム比較解析



以上の結果から、本研究課題ではフタトゲチマダニ標的認識システムに関与すると推測される候補分子群を単離することに成功し、またマダニの運動量変化を自動計測化したことで、マダニの二酸化炭素刺激への応答を詳細に解析することに成功した。この運動量定量化により、今後、候補遺伝子群をノックダウンしたマダニを作製することで、作製した候補遺伝子ノックダウンマダニの宿主放散因子に対する反応を詳細に解析することが可能となった。今後、マダニの標的認識システム解明に向けた研究を行うことで、依然として困難が続くヒトや家畜におけるマダニ媒介性疾患の制圧において、安全性が高く、かつ持続的に実現しうる制圧技術の開発に資すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaji Kayoko, Aonuma Hiroka, Kanuka Hirotaka	4. 巻 24
2. 論文標題 Distribution of tick-borne diseases in Japan: Past patterns and implications for the future	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 499 ~ 504
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2018.03.012	査読の有無 無
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 Tabakawa Yuya, Ohta Takuya, Yoshikawa Soichiro, Robinson Elisabeth J., Yamaji Kayoko, Ishiwata Kenji, Kawano Yohei, Miyake Kensuke, Yamanishi Yoshinori, Ohtsu Hiroshi, Adachi Takahiro, Watanabe Naohiro, Kanuka Hirotaka, Karasuyama Hajime	4. 巻 9
2. 論文標題 Histamine Released From Skin-Infiltrating Basophils but Not Mast Cells Is Crucial for Acquired Tick Resistance in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2018.01540	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kayako Yamaji, Hiroka Aonuma, Taichi Odagawa, Hirotaka Kanuka
2. 発表標題 Loop-mediated isothermal amplification applied to SFTSV vDNA detection in the ticks
3. 学会等名 TICAD7 Official Pre-Event ICREP-NTDs International Symposium
4. 発表年 2019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	嘉糠 洋陸  (kanuka hirotaka)  (50342770)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授     (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関