

平成22年 5月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580363
 研究課題名(和文)：オートファジーがマダニの血液消化と原虫媒介に果たす役割の分子・免疫形態学的解明
 研究課題名(英文)：Molecular and immunomorphological studies on roles of autophagy in blood digestion and protozoa transmission of ticks.
 研究代表者
 松尾 智英 (MATSUO TOMOHIDE)
 鹿児島大学・農学部・准教授
 研究者番号：50383667

研究成果の概要(和文)：マダニ類は顕著な飢餓耐性をもつ吸血性節足動物であり、彼らの長期間にわたる飢餓期間のエネルギー源を理解するために我々は自食作用とも言うべきオートファジーに注目した。まず、オートファジー(HIATG)関連遺伝子をマダニ臓器別ESTデータベースをもとに同定し、分子・免疫形態学的にその発現が遺伝子・タンパク質レベルで飢餓状態にある個体で最大になることを実証した。これにより、マダニの飢餓耐性にオートファジーが重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Ticks are long-lived hematophagous arthropods and have tolerance to starvation. To understand how ticks obtain energy over a long period of non-feeding (starvation), we focused on autophagy, a crucial proteolysis system via the lysosomes for various cellular processes that is induced during starvation in eukaryotes. We identified the homologues of autophagy-related (ATG) genes, and RT-PCR results revealed that their expression of *Haemaphysalis longicornis* ATG (HIATG) genes showed higher levels during the non-feeding period than the feeding period. It was also demonstrated that autophagic organelles were found in the midgut digestive cells of unfed ticks. In conclusion, the starved condition appears to be associated with the increased expression of HIATG genes in the midgut of unfed ticks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：マダニ・フタトゲチマダニ・オートファジー・飢餓耐性・消化・原虫媒介・中腸

1. 研究開始当初の背景

地球上に棲息する15,000種を越える吸血性節足動物の中で、マダニ類はわずか750種に過ぎない小グループであるにもかかわらず、

ヒト以外の動物では第1位、ヒトにおいても蚊に次いで第2位に重要な疾病媒介節足動物とみなされている(Ribeiro, 2003)。その第一の理由は、マダニが魚類以外の全ての脊椎動物に寄生可能な広い宿主域と特有の吸

血・消化機構が可能にする長時間にわたっての大量吸血、またウイルス、リケッチア、原虫をはじめとする寄生虫などほぼ全ての病原体の伝播に関与しうる、他に類を見ない突出した病原体媒介能を持つことにある。さらに、第二の理由としては、オーストラリアの畜産業において「マダニ1匹で肉1ポンドの損失」と言われる通り、マダニとマダニ媒介性疾病によって世界の畜産が被っている経済的損失は、現在もすでにワクチンなど様々な対策が取られているにもかかわらず、過去30年間で毎年70億米ドル以上にのぼっていることである(Nene et al., 2002)。従って、マダニおよびマダニ媒介疾病対策はヒトと動物の健康と畜産業においては不可欠であり、殺ダニ剤抵抗性マダニの頻出や残留薬剤による環境・食物連鎖の汚染などの深刻な問題と相まって、その有効な対策の開発は今や世界的な急務である。しかし、このような重要性・緊急性にもかかわらず、同様の原虫類-節足動物ベクターの関係であるマラリア原虫と蚊に関する研究に比してマダニ類に関する研究は十分でなく、マダニ特有の生存戦略と前述の著しく高い疾病媒介能のメカニズムは未だ解明されていない多くの問題が残されているため、新規の対策技術の確立のためにこれらの解明が緊急に必要である。

2. 研究の目的

(1)一般的に重要視されるヒトや家畜など哺乳類宿主における病原体に関する直接的な研究と平行して、節足動物とその媒介疾病に対する対策としてのワクチンや薬剤の開発を成功させることも重要な要因となる。そのためには、マダニ類において考えれば、その生存基盤である吸血・消化および疾病媒介の成否に重要なマダニ自然免疫のメカニズム解明が重要となる。従って、本研究では、他の吸血性昆虫においてみられるような消化酵素をルーメン内に分泌し、対象物を分解してから吸収する細胞外消化と異なり、消化対象物をほとんど消化せずに細胞内に取り込み、細胞内で消化を行うというマダニ類独特の「細胞内消化」とそれに伴う中腸細胞内における多様なステップをもつ消化様式、さらにはその中腸細胞を通過していかなければならない媒介原虫との関わりに焦点を当てる。すなわち、第一に「消化」の抑制によるマダニ自身のコントロールを、第二にそれによる「原虫病媒介」の抑制を研究目的とした。(2)マダニ類は数年から十年にもおよぶとされる一生の間で、幼虫期の脱皮と成虫期の繁殖のためだけに、わずか3回程度の吸血しか必要とせず、吸血用宿主と出会えなくとも数年間は飢餓状態のまま生存できることが知

られている。一方、近年研究が進んできたオートファジーautophagyは自らの細胞質や細胞内小器官を分解し飢餓を乗り切る「自食作用」と呼ばれる仕組みであり、これがマダニ類における顕著な飢餓回避に極めて重要であり、オートファジー調整によるマダニの生存短縮・中断、つまりマダニの新規防圧法の開発が可能と考えられた。そのため、

- ① 微細・免疫学的観察
- ② オートファジー関連遺伝子情報のホモログ検索と発現確認

により、オートファジーが確かにマダニ類の飢餓ステージで発現し、飢餓回避、つまりはマダニ類の生存に重要な役割を果たしていることを実証することを目指した。

3. 研究の方法

本研究には主に我が国での主要な原虫媒介種であるフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) を供試した。

(1)オートファジーを含めたマダニ中腸における消化のメカニズム

マダニの中腸細胞においては、赤血球は溶血状態で、大腸菌は完全な状態でそれぞれ取り込まれることが明らかとなっており、多様な異物取り込みや消化のメカニズムを持つことが示唆される。マダニ中腸の細胞内消化、および形態的にも通常の消化とは違いがあるとされるオートファジーに関しては、その最初のステップとして形態学的観察が重要になるため、その微細構造を、特に小胞形成・輸送に注目して確認を試みた。

(2)オートファジー関連遺伝子のホモログ検索とタンパク発現

協力研究機関により本研究開始時にはすでにマダニの臓器別 EST データベースの確立も行われており、オートファジーに関する研究がすでに進展している他の生物の関連遺伝子情報をもとに、マダニのデータベースによるホモログ検索、さらに次年度以降の研究への応用のため、その遺伝子情報に基づいたタンパク発現を試みた。

また、そのオートファジー関連遺伝子の発現時期の解明によって、マダニの生存におけるオートファジーの役割を推定することを目指した。

(3)マダニ中腸における消化のメカニズム解析した遺伝子情報や発現タンパクを用いて作成した抗血清を利用し、特に中腸上皮におけるオートファジー関連小胞の膜タンパク発現の解析を免疫形態学的に行った。

4. 研究成果

(1) Cloning and characterization of an autophagy-related gene, *ATG12*, from the

three-host tick *Haemaphysalis longicornis*.

Autophagy is the process of bulk cytoplasmic degradation in eukaryotic cells. In ticks, although it was reported that the autophagic vacuole or autophagosome were observed in midgut cells, there is no report about autophagy-related (*ATG*) genes. The ticks feed meal only three times through their life. Generation time of the hard ticks is 1 to 2 years. Autophagy is induced by starvation condition and is essential for life-span extension, therefore we speculate that autophagy also occurs in ticks. Here, we show tick homologue of an *ATG* gene, *ATG12*, and examined its expression pattern from nymph to adult stages. The sequence analysis showed that *H. longicornis ATG12 (HIATG12)* cDNA is 649 bp and has a 411 bp ORF coding for a 136-amino acid polypeptide with the carboxy-terminal glycine residue, and predicted molecular mass of 15.2 kDa. Moreover, RT-PCR revealed that *HIATG12* was down-regulated when beginning to feed blood. After engorgement, *HIATG12* was up-regulated and it was down-regulated after molting. The expression level of the *HIATG12* was the highest at 3 months after engorgement. By immunoelectron microscopy using anti-GST-HIAtg12 antibody, it was demonstrated that HIAtg12 localized at the surround of granule-like structure. In conclusion, we consider that *HIATG12* might function during the molting and the unfed stage.

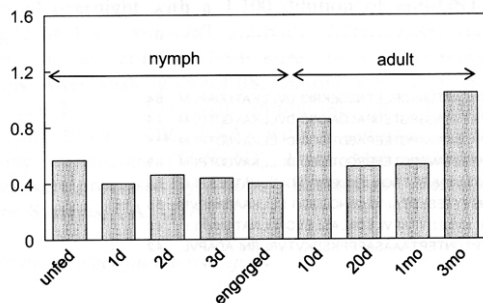


図1 若ダニ期から成ダニ期における *HIATG12* の mRNA 発現パターン

(2) Increased expression of *ATG* genes during nonfeeding periods in the tick *Haemaphysalis longicornis*.

Ticks are long-lived hematophagous arthropods and have tolerance to starvation. They can survive without food during the host-seeking period for several months to years. To understand how ticks obtain energy over a long period of non-feeding (starvation), we focused on autophagy, a crucial proteolysis system via the lysosomes for various cellular processes that is induced during starvation in eukaryotes. In the present study, EST databases

for several organs of the tick *Haemaphysalis longicornis* led to the identification of *HIATG3*, *HIATG4*, and *HIATG8*, homologues of 3 autophagy-related (*ATG*) genes, *ATG3*, *ATG4*, and *ATG8/LC3/GABARAP*, respectively, which are essential for the Atg8 conjugation system in some model animals. Real-time PCR results revealed that the expression of *HIATG3*, *HIATG4*, and *HIATG8* in the tick showed higher levels during the non-feeding period than the feeding period, suggesting that the Atg8 conjugation system is at work in unfed ticks. Notably, their expression levels were higher in the midgut, a digestive organ, of unfed than fed adults. Histological analyses demonstrated that lipids and glycogen accumulated within the epithelial cells of the midgut in unfed ticks, implying that the midgut of unfed ticks serves as storage of those components as nutrients. Furthermore, autophagic organelles were found in the midgut digestive cells of unfed ticks. The starved condition appears to be associated with the increased expression of *HIATG* genes in the midgut of unfed ticks. Tick autophagy might help compensate for the loss of nutrients derived from host blood components during the non-feeding period and the molting process.

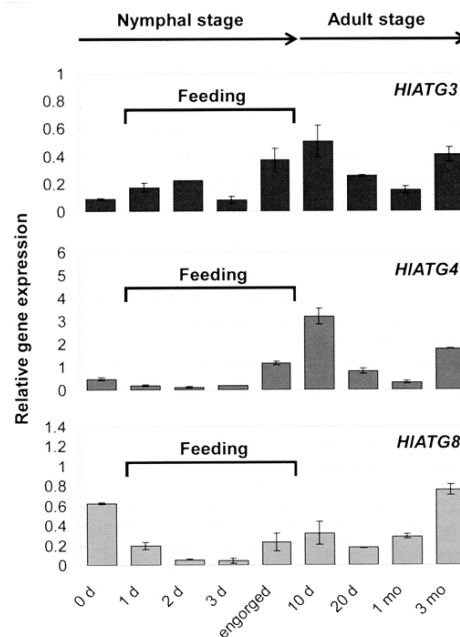


図2 若ダニ期から成ダニ期における *HIATG3, 4, 8* の mRNA 発現パターン

長年、マダニ類の研究を行ってきた我々研究グループが、前述のようなマダニの顕著な飢餓耐性に対して、オートファジーが重要な役割を担っているのではないかとこの仮説のもとに研究を行い、その結果、上記のような結果を得た。すなわち、①明らかにオートフ

ァジーの発現は飢餓期の個体において増大、吸血期の個体において減少し、②微細・免疫形態学的な観察によっても、飢餓期個体の中腸においてオートファゴソーム様構造およびオートファジー関連膜タンパクの局在が確認された。これらのことから、マダニの飢餓期の栄養供給においてオートファジーが重要な役割を担っていることが示された。

これらの成果は吸血性節足動物において世界に先駆けた初めての発見であり、またマダニ類は原虫病の媒介を行うため、マダニの生存に関わるエネルギー供給のメカニズムは、マダニのコントロールにおいて極めて重要な情報となる。そのため、これらのデータは学術雑誌等（Autophagy, Methods in Enzymology）において、依頼投稿も含め、総説としても発表されており、また日本獣医学会および日本寄生虫学会においてベストプレゼンテーション賞として評価された。

残念ながら、マダニ体内への病原体の人為的導入効率の問題もあり、原虫媒介能とオートファジーの関連について明確な成果は上げられなかったが、現在も実験手法の改善を目指し、野外感染個体の利用も検討している。さらに、すでに我々の研究グループにおいて確立されたマダニにおけるRNAi法により、オートファジー発現抑制の影響についての研究にも着手しており、マダニにおけるオートファジーの様々な機能解明に関する研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

（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7件）

① R. Umemiya-Shirafuji, T. Matsuo, M. Liao, D. Boldbaatar, B. Battur, H. Suzuki and K. Fujisaki: Increased expression of *ATG* genes during nonfeeding periods in the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Autophagy* (査読有), 6: 473-481 (2010)

② R. Umemiya-Shirafuji, T. Matsuo and K. Fujisaki: Autophagy in ticks. *Methods in Enzymology* (査読有), 451: 621-638 (2008).

③ R. Umemiya, T. Matsuo, T. Hatta, S. Sakakibara, D. Boldbaatar and K. Fujisaki: Autophagy-related genes from a tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Autophagy* (査読有), 4: 79-81 (2008).

④ R. Umemiya, T. Matsuo, T. Hatta, S. Sakakibara, D. Boldbaatar and K. Fujisaki: Cloning and characterization of an

autophagy-related gene, *ATG12*, from the three-host tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (査読有), 37: 975-984 (2007).

〔学会発表〕（計9件）

① 白藤（梅宮）梨可・松尾智英・藤崎幸蔵：マダニのオートファジー研究の展開：マダニとその媒介病原体の制圧に向けて。第147回日本獣医学会学術集会（2009年4月3日）（宇都宮市）

② Umemiya-Shirafuji, R., T. Matsuo, D. Boldbaatar, M. Liao and K. Fujisaki: Strategy of a three host tick *Haemaphysalis longicornis* against starvation during the nonfeeding period. 6th International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens (2008. 9. 25.) (Buenos Aires, Argentina).

③ 梅宮梨可・松尾智英・D. Boldbaatar・M. Liao・田仲哲也・藤崎幸蔵：フタトゲチマダニのオートファジー関連遺伝子の単離・同定と中腸におけるオートファゴソーム様構造体の観察。第77回日本寄生虫学会大会（2008年4月3日）（長崎市）

④ 梅宮梨可・松尾智英・八田岳士・D. Boldbaatar・田仲哲也・藤崎幸蔵：フタトゲチマダニにおけるオートファジー関連遺伝子の発現動態と未吸血成ダニ中腸細胞における局在。第144回日本獣医学会学術集会（2007年9月3日）（江別市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 智英 (MATSUO TOMOHIDE)
鹿児島大学・農学部・准教授
研究者番号：50383667

(2) 研究分担者

田仲 みほ (TANAKA MIHO)
帯広畜産大・原虫研・博士研究員
研究者番号：80374776
(H19→H20：連携研究者)
藤野 隆志 (FUJINO TAKASHI)
杏林大学・医学部・感染症学・助教
研究者番号：50306677
(H19→H20：連携研究者)

(3) 連携研究者

白藤 梨可 (SHIRAFUJI RIKI)
鹿児島大学・先端獣医学・博士研究員
研究者番号：00549909