

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06416

研究課題名(和文) パベシア原虫の介卵伝播におけるマダニ卵形成関連分子と原虫の分子間相互作用の解明

研究課題名(英文) Interactions between tick oogenesis-related molecules and parasites in the transovarial transmission of Babesia

研究代表者

白藤 梨可 (Rika, Shirafuji)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：00549909

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)：マダニ媒介性原虫のパベシアはマダニ体内で卵巣などの様々な臓器に伝播するが、その伝播メカニズムは不明である。本研究では、マダニの吸血完了(飽血)後～産卵開始前において、体液中に存在する卵黄タンパク質前駆体(ビテロジェニン; Vg)、卵母細胞表面のVg受容体(VgR)などのマダニ卵形成関連分子とパベシアがどのように相互作用するのかを検証した。その結果、未成熟卵母細胞の割合が多い飽血後1日目の体液中に原虫が多く存在すること、パベシアの卵母細胞への伝播にはVg-2が必須であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、パベシア感染マダニモデルを用い、マダニの卵母細胞成熟過程におけるパベシア感染の時系列ならびにパベシア-卵形成関連分子間相互作用の一端を明らかにした。これまで抗マダニワクチン候補分子として注目されることが極めて少なかった卵形成関連分子を解析対象とし、パベシア原虫介卵伝播における卵黄タンパク質前駆体(Vg-2)の重要性を見出した本研究成果は、将来の原虫伝播阻止ワクチンの開発研究へと発展させるための有用な基礎的知見である。

研究成果の概要(英文)：Babesia, a tick-borne protozoan parasite, infects various organs such as the ovary in ticks, but the molecular mechanism is largely unknown. In this study, we examined the interactions between Babesia and tick oogenesis-related molecules, such as egg yolk protein precursor (vitellogenin; Vg) present in the hemolymph and Vg receptor (VgR) on the surface of oocytes, during the pre-oviposition period. It was found that the Babesia DNA level in the hemolymph was the highest 1 day after engorgement, which has immature oocytes in the ovary, and that Vg-2 is an essential molecule for the transmission of Babesia to the ovary.

研究分野：獣医寄生虫学・獣医衛生動物学(特にマダニ)

キーワード：マダニ 原虫 パベシア 介卵伝播 卵形成 卵黄タンパク質前駆体 卵黄タンパク質前駆体受容体

1. 研究開始当初の背景

マダニは、脊椎動物（魚類を除く）を宿主とする偏性吸血性節足動物である。マダニによる被害には、吸血による掻痒感、ストレス、重度寄生による貧血などの直接的被害と、吸血時に様々な病原体（原虫、細菌、ウイルスなど）を媒介する間接的被害があるが、後者が極めて深刻である。中でも、マダニ媒介性原虫による牛のピロプラズマ病は、貧血と発熱を主な症状とする獣医学上重要な疾病の一つであり、畜産業における経済的被害が日本を含む世界各地で報告されている。

国内で認められる牛のピロプラズマ病は他国に比べ病原性が低いが、他の病原体との混合感染時や宿主の免疫状態により症状が悪化することが知られている。現状では感染・発病を阻止するワクチン・治療薬は存在せず、マダニ対策としての薬剤（殺ダニ剤）の使用が唯一のピロプラズマ病予防法となっている。しかし、生息マダニの種や活動時期を把握した上で計画的に薬剤を牛体に塗布しなければ効果は得られず、また、殺ダニ剤の不適切な使用による薬剤耐性マダニの出現や環境・食物連鎖の汚染、畜産業従事者の健康被害が国内外で問題視されている。

2. 研究の目的

殺ダニ剤の適切な使用と抗マダニワクチンの併用、すなわち、マダニの吸血源となる宿主動物の体表上ならびに体内の両方向からのマダニ対策が、マダニの吸血ならびに原虫媒介を阻止する理想的なピロプラズマ病防除法と考えられる。しかし、これまで多数のワクチン候補分子が同定されたが、マダニの吸血を完全に阻害した例、ピロプラズマ病の病因原虫（バベシア）の媒介を阻止した例は無い。そこで本研究では、バベシア原虫の介卵伝播におけるマダニ卵形成関連分子と原虫の分子間相互作用の解明を図り、原虫介卵伝播阻止ワクチン開発に繋げるためのシーズを見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マダニ卵母細胞選抜法の確立

マダニの卵母細胞は吸血後にステージ I から V へと発育し成熟するが、その成熟は非同期的であり、卵巣内に存在する全卵母細胞の発育ステージには統一性が無い。バベシアが「いつ」「どの」卵母細胞に感染するかを明らかにするためのツールとして、卵母細胞を発育ステージ別に選抜する方法の確立を試みた。

フタトゲチマダニ（単為生殖系）雌ダニをウサギで吸血させ、吸血フェーズごとに卵巣を回収し、組織切片を作製した。また、卵黄タンパク質前駆体（ビテロジェニン；Vg）受容体（VgR）遺伝子発現を RNA 干渉法により抑制し、その卵巣組織切片についても作製した。各切片を用い、以前我々が設定した卵母細胞発育ステージの基準 [Mihara, Umemiya-Shirafuji et al., 2018] に従い、各吸血フェーズにおける卵母細胞をステージ I~V に分類した。

各発育ステージの卵母細胞における VgR mRNA の発現・VgR タンパク質の局在を解析した。

< 引用文献 >

Mihara R, Umemiya-Shirafuji R, Abe Y, Matsuo T, Horiuchi N, Kawano S, Fujisaki K, Suzuki H. The development of oocytes in the ovary of a parthenogenetic tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol Int.* 2018; 67(4):465-471.

(2) バベシア（キネート）精製法確立の試み

マダニの吸血により中腸（消化管）内腔に到達したバベシアは、中腸上皮細胞に侵入し、分裂増殖後、「キネート」と呼ばれる形態に分化する。次いでキネートは体液中へ移動し、卵巣などの細胞に感染する。卵母細胞におけるバベシア感染の評価法確立を目的として以下の実験を実施した。

人工吸血法によりバベシア *Babesia ovata* 感染牛赤血球をフタトゲチマダニ（単為生殖系）雌ダニに吸血させ、飽血後～産卵開始前（飽血後 0、1、2、3、4 日目）において、経日的に卵巣ならびに体液を回収した。

回収した各臓器よりゲノム DNA を抽出し、*B. ovata* -*tubulin* 遺伝子を標的とした Nested PCR を行い、-*tubulin* 遺伝子が増幅されるタイミングを検証した。

(3) 卵形成関連分子とキネートの分子間相互作用解析

卵形成関連分子とキネートの相互作用を検証することを目的として、大腸菌発現系でグルタチオントランスフェラーゼ（GST）融合 Vg または VgR タンパク質の作製を試みた。

上記（2）と同様にバベシア感染牛赤血球または非感染牛赤血球を人工吸血法によりフタ

トゲチマダニ雌ダニに吸血させ、飽血後 1~4 日目の卵巣、飽血後 1 日目の体液、飽血 2 日目の脂肪体 (Vg 合成器官) を回収し、タンパク質を抽出した。
先行研究により、バベシア感染マダニにおいて Vg 遺伝子発現が増大・Vg タンパク量が増加する [Umemiya-Shirafuji et al., 投稿中] という知見が得られていたことから、RNA 干渉法による Vg 遺伝子発現抑制を行い、バベシア感染または非感染マダニ間での卵形成関連分子の動態ならびに原虫感染能を評価した。

4. 研究成果

(1) マダニ卵母細胞選抜法の確立

各吸血フェーズにおける卵巣組織切片を観察し、VgR mRNA の発現および VgR タンパク質の局在を観察したところ、ステージ III までの卵母細胞において VgR mRNA が検出され、また、ステージ I~III の細胞質内およびステージ IV、V の細胞質辺縁に VgR タンパク質が検出された。さらに、飽血後 4 日目の対照群の卵巣にはステージ I~V の卵母細胞が存在したのに対し、VgR 遺伝子発現抑制雌ダニではステージ III までの卵母細胞が存在しており、ステージ IV、V は存在しなかった。これらのことから、卵母細胞は急速吸血期にステージ I から II、飽血後にステージ II から III へと発育し、次いで、VgR を介した Vg 取り込みが活発化することによりステージ III から IV へと発育することが明らかになった。これらの成果は Parasites & Vectors 誌に掲載された [Umemiya-Shirafuji et al., 2019] 。

(2) バベシア (キネート) 精製法確立の試み

バベシア感染牛赤血球を吸血させた雌ダニの卵巣では飽血後 1~4 日目に、体液では飽血後 1 日目に *B. ovata* -*tubulin* 遺伝子が検出された。今回得られた結果は、吸血によって中腸内腔に到達したバベシアは飽血後 24 時間以内に中腸から体液中に移動するという先行研究の知見 [Maeda, Umemiya-Shirafuji et al., 2016] に一致しており、さらに本研究の実施によって、キネートが体液中に多く存在するタイミングは飽血後 1 日目であることが示唆された。したがって、卵母細胞におけるバベシア感染の評価法においては、上述の (1) の成果を踏まえ、飽血後 1~4 日目の卵巣と飽血後 1 日目の体液サンプルを解析対象とすることが適当であると考えられた。次に、マダニ体液からのキネート精製法の確立を試みたが、結果を得ることができなかった。飽血後 1 日目の体液サンプルにおいて Nested PCR により *B. ovata* 遺伝子が検出されていたが、原虫量としては非常に少なかったため、精製法の確立にはさらなる検証が必要であると考えられる。

< 引用文献 >

Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Matsubayashi M, Miyoshi T, Umemiya-Shirafuji R, Kawazu SI, Igarashi I, Mochizuki M, Tsuji N, Tanaka T. Establishment of a novel tick-*Babesia* experimental infection model. Sci Rep. 2016; 6: 37039.

(3) 卵形成関連分子とキネートの分子間相互作用解析

以上のデータを基に、バベシア感染牛赤血球を人工吸血法により雌ダニに吸血させ、飽血後 1~4 日目の卵巣および脂肪体、飽血後 1 日目の体液を回収した。これらをマダニ卵形成関連分子と *B. ovata* キネートとの相互作用解析のためのサンプルとした。次に、卵形成関連分子の GST 融合組換えタンパク質の作製を試みたが、大腸菌での組換えタンパク質発現が認められなかった。そのため、組換えタンパク質作製法の検討と並行して、上述のとおり回収したバベシア感染・非感染マダニサンプルのうち、脂肪体 (飽血後 2 日目) よりタンパク質を抽出し、プロテオーム解析に供した。*B. ovata* 感染時に発現変動するタンパク質を検証した結果、興味深い分子を複数見出した。これらについては今後より詳細に検証し、原虫感染における役割を明らかにする予定である。

また、フタトゲチマダニの Vg には Vg-1、Vg-2、Vg-3 の 3 つがあるが、いずれもバベシア感染時に発現変動することが明らかになった。これらの成果の一部は Frontiers in Physiology [Zheng, Umemiya-Shirafuji et al., 2020] ならびに Pathogens [Zheng, Umemiya-Shirafuji et al., 2020] に掲載された。次いで、RNA 干渉法による Vg-2 遺伝子発現抑制を行ったところ、Vg-2 遺伝子発現抑制雌ダニでは対照群とは異なるバベシア感染率を示したことから、マダニにおけるバベシアの介卵伝播に Vg-2/Vg-2 が重要な役割を担うことが推測された [Umemiya-Shirafuji et al., 投稿中]。以前我々は VgR がバベシアの介卵伝播に必須であることを報告したが、今回の研究により、VgR、Vg とともにマダニ体内におけるバベシアの体内伝播に必要不可欠であることを世界で初めて明らかにした。Vg-2 以外の Vg とバベシアとの相互作用については現在解析を進めている。

本研究課題では卵母細胞の成熟過程における原虫感染の時系列と分子間相互作用とを関連付け「バベシア原虫介卵伝播メカニズム」の一端を明らかにすることができた。VgR と Vg は卵形成に必須の分子でもあるため、抗マダニワクチンかつ原虫伝播阻止ワクチンの候補分子として今後も研究対象にすべき重要な分子と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zheng Weiqing, Umemiya-Shirafuji Rika, Chen Shengen, Okado Kiyoshi, Adjou Moumouni Paul Franck, Suzuki Hiroshi, Yang Shu, Liu Mingming, Xuan Xuenan.	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of Haemaphysalis longicornis Genes Differentially Expressed in Response to Babesia microti Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 378 ~ 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens9050378	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 該当する
1. 著者名 Zheng Weiqing, Umemiya-Shirafuji Rika, Zhang Qian, Okado Kiyoshi, Adjou Moumouni Paul Franck, Suzuki Hiroshi, Chen Haiying, Liu Mingming, Xuan Xuenan.	4. 巻 11
2. 論文標題 Porin Expression Profiles in Haemaphysalis longicornis Infected With Babesia microti	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 502 ~ 502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.00502	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 該当する
1. 著者名 Umemiya-Shirafuji R, Mihara R, Fujisaki K, Suzuki H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Intracellular localization of vitellogenin receptor mRNA and protein during oogenesis of a parthenogenetic tick, Haemaphysalis longicornis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13071-019-3469-9	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 Umemiya-Shirafuji R, Fujisaki K, Okado K, Adjou Moumouni PF, Yokoyama N, Suzuki H, Inoue N, Xuan X.	4. 巻 70
2. 論文標題 Hard ticks as research resources for vector biology: from genome to whole-body level	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 181 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7601/mez.70.181	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 該当する

1. 著者名 白藤(梅宮) 梨可	4. 巻 70
2. 論文標題 原虫介卵伝播メカニズムの解明に向けたマダニ卵形成の基礎的研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 衛生動物	6. 最初と最後の頁 137 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7601/mez.70.137	査読の有無 無
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3件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 白藤梨可
2. 発表標題 マダニにおける原虫の介卵伝播メカニズム
3. 学会等名 第71回日本衛生動物学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白藤(梅宮) 梨可、國寄 真希、岡田 美穂、鈴木 宏志.
2. 発表標題 Babesia ovata感染フタトゲチマダニにおける卵形成関連分子の役割
3. 学会等名 第28回日本ダニ学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 直正宗一郎、佐藤成子、Bumduuren Tuvshintulga、鈴木宏志、白藤(梅宮)梨可.
2. 発表標題 フタトゲチマダニにおけるATAQ遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第30回日本ダニ学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Rika Umemiya-Shirafuji	4. 発行年 2021年
2. 出版社 CABI	5. 総ページ数 592
3. 書名 Climate, Ticks and Disease (Editor: Pat Nuttall): eo27: Distribution, seasonal occurrence, and biological characteristics of Haemaphysalis longicornis, a vector of bovine piroplasmiasis in Japan.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

帯広畜産大学 原虫病研究センター https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/

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	横山 直明 (Yokoyama Naoaki)		
研究協力者	玄 学南 (Xuan Xuenan)		
研究協力者	堀内 雅之 (Horiuchi Noriyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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	川瀬 撰 (Kawase Osamu)		

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