

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16237

研究課題名（和文）糖類の中腸環境改変効果を利用した吸血昆虫における病原体媒介因子の特定

研究課題名（英文）Identification of factors defining vector competence in blood sucking insect using biological effects of sugars

研究代表者

水島 大貴（Mizushima, Daiki）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50843455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マラリアやリーシュマニア症は、ヒトに深刻な症状を呈する吸血昆虫媒介感染症である。両病原体が感染可能な吸血昆虫（ベクター）は決まっているが、どのような因子によって規定されているのかは不明である。本研究では、病原体の発育・ヒト感染能力を獲得する上で重要な吸血昆虫の中腸に着目し、生体調節機能を有する糖類を用いて中腸環境を変化させることで感染の成否を決定づける因子を明らかにする。16種の糖類の内、希少糖D-アロースのみがマラリア原虫発達阻害効果を示し、その作用機序に関与する因子を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、生体調節機能をもつ糖類を利用して、病原体発育・ヒト感染性獲得の成否を決定づける因子を明らかにすることである。数多くの糖類は、機能性食品や健康食品への応用研究が盛んに行われている。しかし、ベクターの病原体媒介のメカニズムを明らかにすることを目的とした研究は国内外問わず行われていない。本研究課題の成果は、病原体媒介の謎に迫るだけでなく、希少糖を始めとした糖類を用いた新たなベクターコントロール法の創出に繋がるものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Malaria and leishmaniasis are vector-borne diseases caused by blood-sucking insects transmitting Plasmodium and Leishmania parasites. Although the vectors of the parasites are defined, the determinants for vector specificity are unknown. We focused on the midgut of their vectors of which are important to develop and to acquire the infectivity with human for their parasites. We attempted to identify the determinant for infection using sugars possessing biological functions. This study showed that 1) a rare-sugar, D-allose, has the inhibitory effect for Plasmodium parasite development in the midgut. 2) A factor participating in the inhibition was identified.

研究分野：寄生虫学

キーワード：糖類 マラリア ハマダラカ リーシュマニア サシチョウバエ 細菌叢

1. 研究開始当初の背景

マラリアやリーシュマニア症といったヒトに深刻な病気をもたらす節足動物媒介感染症の病原体は、吸血昆虫(ベクター)によって哺乳動物に媒介される。

これまで、病原体の発育・ヒト感染性の獲得は、“ベクター種と病原体との組み合わせによって規定される”と考えられてきた。実際に、マラリアの病原体であるマラリア原虫はハマダラカによって媒介されるが、同じ蚊のヤブカやイエカでは媒介されない。リーシュマニア症の病原体であるリーシュマニア原虫はサシチョウバエによって媒介されるが、旧大陸サシチョウバエと新大陸サシチョウバエとの間で媒介されるリーシュマニア原虫の種が異なることが明らかになっている。しかし、当研究室が実施した新大陸におけるリーシュマニア症とサシチョウバエの疫学調査により、ある新大陸サシチョウバエ種が媒介するリーシュマニア症原虫種は、分布地域によって異なるということがわかった(Kato et al. *Acta Trop.* 2015)。つまり、病原体とベクター種との関係は、必ずしもそれらの組み合わせに規定されるとは限らないことが示唆された。これらの事実は、“病原体の発育・ヒト感染性の獲得はベクター種と病原体との組み合わせによって規定される”という従来の考えに疑問を提示するものである。では、病原体媒介の成否を決定づける要因は何か。

病原体は媒介されるために、ベクターの中腸を経てヒトに感染可能な形態へと発育することが必要不可欠である。すなわち、中腸における病原体発育の成否がヒトへの感染成立を左右する。ベクターの中腸は、消化器官としてだけでなく、有益な細菌叢を維持していく上で重要な免疫反応が繰り返し広げられる場でもある。近年、抗生物質をベクターに投与することで、中腸内のオーシスト(中腸発育ステージのマラリア原虫)数が上昇すること(Gendrin et al. *Nat Commun.* 2015)、反対に、サシチョウバエにおいてはメタサイクリック型(ヒト感染型)リーシュマニア原虫数の低下が確認されている(Kelly et al. *MBio.* 2017)。これらのことから、抗生物質による中腸細菌叢の変化が病原体の感染率に大きな影響を与えていることが予測された。さらに、当研究室において、血液以外の餌である糖類に、天然にごく僅かにしか存在しない糖類である希少糖を混合して摂取させると、サシチョウバエでは、希少糖が中腸細菌叢を変化させていることを次世代シーケンス解析により確認している。ハマダラカにおいても、中腸細菌叢の変化に加え、オーシスト数が減少することを確認している。実際に、ヒトでは、希少糖、オリゴ糖並びに糖アルコール(キシリトールといった低カロリー甘味料)が、腸内細菌叢をヒトの生命活動に有利な群集構造に改善するだけでなく、腸管免疫を賦活化することで病原体の排除にも貢献していることが明らかになっている。以上のことから、申請者は、病原体発育・感染性獲得の成否を決定づける因子が中腸細菌叢の構成及びそれに応じて変化する中腸上皮細胞の免疫応答にあるとの仮説に到達した。よって、ベクター中腸の細菌叢と免疫応答を理解することで、本研究課題の学術的問いである「病原体媒介の成否を決定づける要因は何か」に答えることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腸内環境の改変効果をもつ糖類を利用して、病原体発育・ヒト感染性獲得の成否を決定づける因子を明らかにすることである。数多くの糖類は、機能性食品や健康食品への応用研究が盛んに行われている。しかし、ベクターの病原体媒介のメカニズムを明らかにすることを目的とした研究は国内外問わず行われていない。以上のことから、本研究課題は、希少糖を始めとした糖類が持つ腸内環境を改変する効果を利用した独自のアプローチであり、単純な“病原体-ベクター感染”モデルでは観察できない新たな生物間相互作用を見出すことが期待される。そして、その現象を解明することで、病原体媒介の謎に迫るだけでなく、希少糖を始めとした糖類を用いた新たなベクターコントロール法の創出に繋がるものと考えている。

3. 研究の方法

3.1. 中腸内における病原体発育に効果を示す糖類のスクリーニング

中腸内における病原体発育に効果を示す糖類をスクリーニングするため、糖類(オリゴ糖、キシリトール等の糖アルコール、希少糖)をベクターに摂取させ、その後、ルシフェラーゼ遺伝子組換え原虫を感染させる。そして、ルシフェラーゼアッセイにより原虫発育度を定量した。

3.2. メタゲノム解析による糖類に制御される中腸細菌群の同定

スクリーニングされた糖類を摂取させた病原体感染ベクター中腸内の細菌叢を解析するため、可変領域 V3-V4 をターゲットとした 16SrRNA アンプリコンシーケンス解析を行った。病原体感染ベクターにスクリーニングされた糖類の摂取群と非摂取群を設定し、それらの中腸から調製された DNA および V3-V4 増幅プライマーセットにより DNA ライブラリーを調製した。Miseq(300 cycles, paired-end)によりシーケンス解析を行った。

3.3. RNA-seq による糖類に制御される中腸上皮細胞の免疫関連遺伝子の探索

スクリーニングされた糖類が病原体感染ベクターの中腸上皮細胞における免疫応答に関わる遺伝子の発現動態を明らかにするため、トランスクリプトーム解析を行った。病原体感染ベクターにスクリーニングされた糖類の摂取群と非摂取群を設定し、感染 3 日後の中腸から調製された Total RNA を用いてライブラリーを調製し、Novaseq(150 cycles, paired-end)によりシーケンス解析した。発現変動遺伝子がコードするタンパク質の機能を推定するために、VectorBase より遺伝子配列を取得し、さらに NCBI Blast 検索を実施した。

3.4. ハマダラカの XDH 遺伝子の機能解析

D-アロース摂取時のマラリア原虫感染と AsXDH の関係を明らかにするため、XDH 阻害剤であるアロプリノールをハマダラカに摂取させたときのネズミマラリア原虫のオーシスト数を検討した。また、D-アロースを摂取させた感染ハマダラカ中腸の AsXDH 発現動態を定量 PCR、XDH 酵素活性を XDH の補酵素である NADH の吸光度測定により解析した。

4. 研究成果

4.1. 中腸内における病原体発育に効果を示す糖類のスクリーニング

中腸内におけるネズミマラリア原虫の発達を阻害する糖類のスクリーニングしたところ、16 種類の糖類の内、希少糖である D-アロースを摂取させた群でのみ、オーシスト数が顕著に減少した(図 1A)。D-アロース摂取群の中腸内オーキネート数は、非摂取群と大きな差は見られなかった(図 1B)。以上のことから、今回検討した 16 種類の糖類の内、希少糖の D-アロースのみがマラリア原虫の発達を阻害する効果を示した。また、D-アロース自体がオーキネートに対して作用しないことが示唆された。

一方、サシチョウバエ中腸におけるリーシュマニア原虫の発達阻害も検討した。今回、旧大陸サシチョウバエと、それによって媒介されるリーシュマニア原虫の組み合わせで実施したが、リーシュマニア原虫の感染効率が不安定であり検討が困難であった。このことから、コロニー化されたサシチョウバエとリーシュマニア原虫の人工感染実験系の再検討が必要であることがわかった。

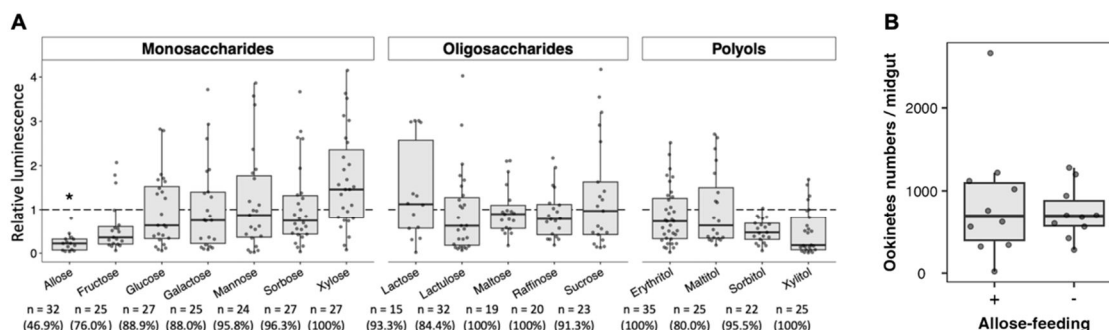


図1. ハマダラカ中腸におけるマラリア原虫発達を阻害する糖類のスクリーニング(A)と中腸オーキネート数(B)
n:解析個体数, 括弧内:感染率

4.2. メタゲノム解析による糖類に制御される中腸細菌群の同定

相対中腸細菌量は、吸血 3 日後に細菌量が増加する D-アロース非摂取群と比較して、D-アロース摂取群の相対細菌量は増加しない傾向にあった(図 2A)。D-アロース摂取・非摂取にかかわらずネズミマラリア原虫感染ハマダラカ群の中腸細菌叢は、*Phyllobacterium* 属、*Leucobacter* 属、および *Staphylococcus* 属が主要構成細菌であった(図 2B)。非摂取群と比較して、いずれの日数においても D-アロース摂取群の細菌構成の変動に顕著な差は見られなかった(PERMANOVA, pseudo- $F = 1.03$, $P = 0.371$)。抗生物質により中腸細菌量を低下させることで、マラリア原虫のオーシスト数が増加することが報告されている。抗生物質の摂取の有無にかかわらず、D-アロース摂取群では、マラリア原虫のオーシスト数が減少していた(図 2C)。これらの結果から、中腸細菌叢は D-アロースが持つマラリア原虫発達阻害効果の主たる要因ではないことを明らかにした。この研究成果は国際誌に発表した。

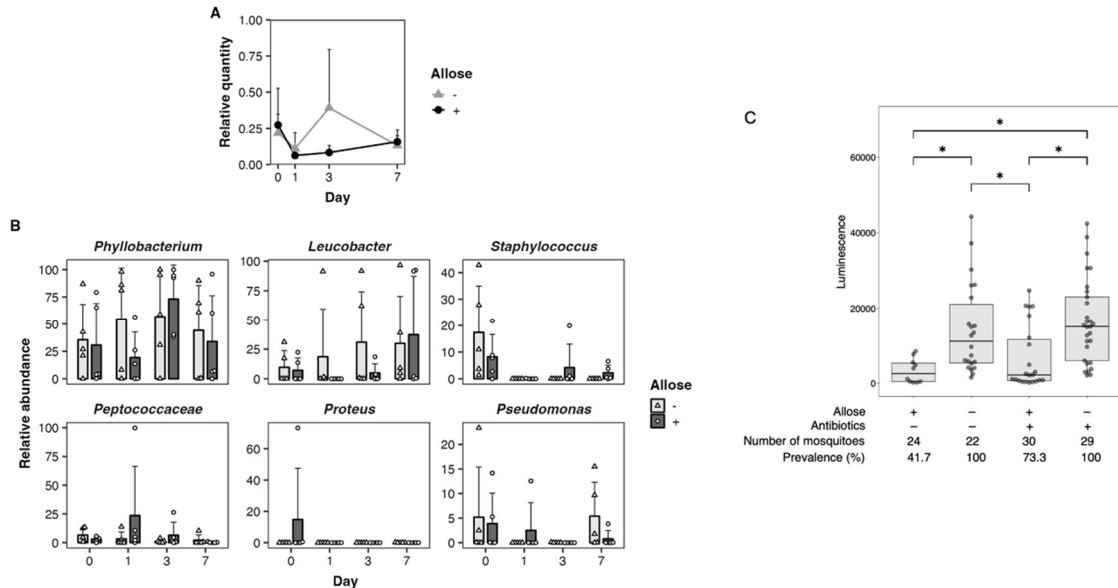


図2. D-アロース摂取・非摂取時のハマダラカ中腸の相対的な中腸細菌量(A)、各構成細菌の経時変化(B) 及び抗生物質摂取時のD-アロースのマラリア原虫発達阻害(C)

4.3. RNA-seq による糖類に制御される中腸上皮細胞の免疫関連遺伝子の探索

D-アロース摂取時のネズミマラリア原虫感染ハマダラカ中腸のトランスクリプトーム解析を実施したところ、181 遺伝子が有意に発現変動していた。主に、物質代謝、糖鎖修飾および細胞周期に関わる遺伝子が変動していたが、免疫関連遺伝子は変動していなかった。発現変動遺伝子群の内、ASTE016377 遺伝子が最も発現誘導されていた ($\text{Log}_2 \text{FC} = 4.6$)。NCBI Blast 解析により、ASTE016377 遺伝子は 3964 bp、1267 アミノ酸残基から成るキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) をコードしていることがわかった。XDH は、基質である尿素と補酵素 NAD^+ を触媒し抗酸化作用のある尿酸と NADH を生成する酵素であるが、これまでにマラリア原虫の発達と関連する研究はなされていない。以上のことから、D-アロース摂取によって発現誘導されるハマダラカの XDH が中腸におけるマラリア原虫の発達阻害に関わる新たな因子であることが推測された。

4.4. ハマダラカの XDH 遺伝子の機能解析

アロプリノール摂取により、D-アロース摂取群のオーシスト数が部分的に復帰した。D-アロースを摂取させた感染ハマダラカ中腸の *AsXDH* 遺伝子発現動態を定量 PCR により解析した。*AsXDH* 遺伝子発現量はオーシスト発達時期である感染 3-5 日後でピークに達し、その後徐々に減少した。一方、感染 5 日目の中腸における XDH 酵素活性を測定したところ、D-アロース摂取の有無で顕著な活性の差は見られなかった。以上の結果から、*AsXDH* がオーシスト発達阻害の一端を担うことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daiki Mizushima, Daisuke S Yamamoto, Ahmed Tabbabi, Meiji Arai, Hiroto Kato	4. 巻 13
2. 論文標題 A rare sugar, allose, inhibits the development of Plasmodium parasites in the Anopheles mosquito independently of midgut microbiota.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in cellular and infection microbiology	6. 最初と最後の頁 1162918
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2023.1162918	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水島 大貴, Ahmed Tabbabi, 山本 大介, 新井 明治, 加藤 大智
2. 発表標題 キサンチンデヒドロゲナーゼ(XDH)は希少糖アロースのハマダラカ中腸におけるマラリア原虫の発達抑制機構に関与する
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水島 大貴, Ahmed Tabbabi, 山本 大介, 新井 明治, 加藤 大智
2. 発表標題 ハマダラカの中腸環境を変化させる糖類のスクリーニング
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会大会・第32回日本臨床寄生虫学会大会合同大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------