

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880038

研究課題名（和文）マダニにおけるオートファジーの分子機構の解明とその制御因子の同定

研究課題名（英文）Study on the molecular mechanism of autophagy at nonfeeding periods in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*

研究代表者

白藤 梨可 (SHIRAFUJI RIKA)

鹿児島大学・農学部・プロジェクト研究員

研究者番号：00549909

研究成果の概要（和文）：獣医・医学上重要な吸血性節足動物マダニについて、数年に及ぶ生活史の大半を未吸血・飢餓状態で過ごすという性質に着目し、マダニの飢餓耐性を担う分子基盤の解明を実施した。未吸血マダニにおけるオートファジー関連遺伝子群の発現抑制ならびにオートファジー阻害剤処理により、実験群のマダニにおいて寿命が短縮した。このことから、宿主探索時のマダニはオートファジーを活用して栄養分を補い、飢餓に耐えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Ticks are hematophagous arthropods and they can survive without food during the host-seeking period for several months to years. This study focused on autophagy which is induced during starvation in eukaryotes. Knockdown of autophagy-related genes and treatment with autophagy inhibitor led to a shortened life span in adult ticks. Tick autophagy might help compensate for the loss of nutrients derived from host blood components during the non-feeding period.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：マダニ、オートファジー、オートファジー関連遺伝子、飢餓、寿命、Target of rapamycin、ピテロジェニン

1. 研究開始当初の背景

吸血性節足動物であるマダニは、家畜や野生動物だけでなくヒトでも吸血し、獣医・医学上極めて重要な外部寄生虫となっている。また、マダニの加害は、吸血による直接的加

害に加えて、マダニが吸血によって媒介する多種多様な病原体（細菌、ウイルス、原虫など）による間接的加害がより深刻であり、畜乳生産に及ぼすマダニの経済的加害や人獣の公衆衛生における重要性は、世界各国で報

告されている。わが国においても、マダニ媒介性疾患の一つである日本紅斑熱によるヒトの死亡例が2008年に発表された。しかし、国内外においてマダニ媒介性新興・再興感染症の発生が懸念されているにもかかわらず、マダニとその媒介病原体に対する殺ダニ剤・ワクチン等を用いた現行の制圧法は、薬剤耐性マダニの出現や環境問題の観点から不十分とされており、効果的かつ安全性の高い新規制圧法が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究では、数年に及ぶ生活史の大半を未吸血・飢餓状態で過ごすというマダニの性質に着目し、マダニの飢餓耐性に関わる遺伝子および分子の特性解明を行い、マダニの長寿命を担う分子基盤とその制御機構を明らかにすることを目的とする。特に、未吸血期のマダニにおけるオートファジーの分子機構の全容解明を図ることによってマダニの飢餓耐性・長寿命の制御機構を明らかにする。さらに、得られた知見をマダニとその媒介病原体に対する効果的で安全性の高い新規制圧法への応用に繋げることを最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) マダニ新規オートファジー関連 (ATG) 遺伝子の単離・同定

フタトゲチマダニ EST データベースを用いて ATG 遺伝子の相同遺伝子の探索を行い、得られた cDNA の塩基配列を決定した。

(2) マダニにおけるオートファジーのモニタリング法の開発

①上記3. (1)で単離した cDNA 塩基配列情報に基づき、マダニ新規オートファジー関連 (Atg) タンパク質について、大腸菌発現系で組換えタンパク質を作出し、マウスポリクローナル抗体の作製を行った。

②オートファジーのモニタリング法がマダニではまだ確立していないため、モデル生物を用いた研究を参考に、オートファジー誘導時に細胞質内に出現するオートファゴソーム膜上に局在する Atg8 タンパク質に着目した。既に作製済みの、Atg8 に相同なフタトゲチマダニ Atg8 (H1Atg8) に対する抗体を用いて、マダニにおけるオートファジーのモニタリング法開発を試みた。すなわち、抗 H1Atg8 抗体を用いたウエスタンブロット法による H1Atg8 の検出、蛍光抗体法による免疫染色ならびに免疫電顕法により、最適なモニタリング法について検討した。電子顕微鏡を用いた観察については、連携研究者である松尾智英准教授 (鹿児島大学) によって実施された。

③リアルタイム PCR 法によるマダニ *ATG* (*HIATG*) 遺伝子の発現解析を行い、飢餓時に発現が上方調節される *HIATG* 遺伝子を調べた。遺伝子レベルでの発現解析結果と、上記(2)②で行ったタンパク質レベルでのモニタリング法とを総合的に解釈し、マダニにおけるオートファジーのモニタリング法を確立した。

④オートファジーの間接的検出法として哺乳動物細胞やショウジョウバエを用いた研究で行われている脂肪染色、蛍光色素 (LysoTracker) を用いたリソソームの検出についてもマダニオートファジーのモニタリング法として利用可能かどうかを検証した。

(3) マダニ *ATG* 遺伝子群/Atg タンパク質群の機能解析

①RNA 干渉 (RNAi) により *HIATG* 遺伝子の発現抑制を行い、対照群と RNAi 処理群との表現型の比較を行った。

②オートファジーの阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) を用いたインヒビターアッセイを行った。すなわち、マイクロインジェクターを用いて 3-MA を未吸血 (飢餓) マダニにインジェクションし、インジェクション後のマダニの表現型解析ならびにウエスタンブロット法による H1Atg8 タンパク質の検出を行った。

(4) マダニオートファジーの制御因子の同定

①インスリンシグナル、アミノ酸シグナル、エネルギー代謝、栄養シグナル伝達経路がオートファジーを制御することが様々な生物種において報告されている。そこで、オートファジーの制御因子として知られる Target of rapamycin (TOR) に着目し、その遺伝子クローニングを試みた。TOR の相同遺伝子はフタトゲチマダニ EST データベース上に存在しなかったため、degenerated PCR 法によるクローニングを実施した。すなわち、フタトゲチマダニ雌成ダニの卵巣から total RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。他生物種の TOR タンパク質の部分的なアミノ酸配列情報をもとにプライマー (混合オリゴヌクレオチド) を設計し、合成した cDNA を鋳型として PCR を行った。この方法により TOR 遺伝子断片を得ることができ、5' 上流の未知領域および 3' 下流の未知領域をクローニングするために、5' および 3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を行った。

②リアルタイム PCR 法によるマダニ *TOR* (*HITOR*) 遺伝子の発現解析を行った。

③RNAi 法による *HITOR* 遺伝子の発現抑制を実施し、表現型の解析を行った。また、TOR 経路における TOR の下流因子 S6 キナーゼ (S6K)

の発現についてもウエスタンブロット法により解析した。

④未吸血マダニに TOR 阻害剤である rapamycin をインジェクションし、H1Atg タンパク質の発現を調べ、未吸血時のマダニにおける TOR とオートファジーの関連性について検討した。

⑤飽血マダニに rapamycin をインジェクションし、表現型解析ならびに S6K の発現解析を行った。

(5) マダニの飢餓期における糖および脂質代謝の解析

①マダニの栄養貯蔵器官である中腸について、糖染色・脂肪染色を行い、組織学的に糖および脂質を検出した。

②フタトゲチマダニ EST データベースを用い、糖代謝および脂質代謝に関わる酵素をコードする遺伝子の単離を試みた。

4. 研究成果

(1) マダニ新規 *ATG* 遺伝子の単離・同定

フタトゲチマダニの EST データベースを用いて、オートファゴソーム形成過程に必須な *ATG6* の相同遺伝子を探索し、その cDNA を単離することに成功した。*HLATG6* cDNA 遺伝子配列を日本 DNA データバンク (DDBJ) に登録した(アクセッション番号 AB601889)。*ATG6* 相同遺伝子をマダニから単離したのは本研究が世界で初めてである。

(2) マダニにおけるオートファジーのモニタリング法の開発

①上記 4. (1)において単離した *HLATG6* 遺伝子配列を基に大腸菌発現系を用いて組換えタンパク質を作製し、H1Atg6 に対するマウス抗血清を作製した。

②フタトゲチマダニ Atg8 (H1Atg8) に対する抗体を用いてウエスタンブロット法ならびに蛍光抗体法による免疫染色を行い、内在性 H1Atg8 の検出を試みた。抗マダニ Atg8/LC3 (H1Atg8) 抗体を用いたウエスタンブロット法では、他生物種と同様に LC3-I および LC3-II に相当する 2 本のバンドを検出することができ、本法はマダニにおけるオートファジーのモニタリングに有用であることが明らかになった。しかしながら、蛍光抗体法による免疫染色ならびに免疫電顕法では、H1Atg8 の細胞内局在を検出することができなかつたため、今後のさらなる検討が必要であると考えられた。一方、既に作製済みの H1Atg3、H1Atg4、H1Atg6、H1Atg12 に対する抗体についても、マダニにおけるオートファジーのモニタリング法に有用か否か検討したが、H1Atg8 に対する抗体の使用が最も適すると考えられた。

③リアルタイム PCR 法では、中腸・卵巣・脂肪体における *HLATG8* の発現が吸血時に比べて未吸血時に増大することが明らかになった。このことは未吸血(飢餓)時に *ATG8* 遺伝子の発現が各臓器において上方調節されることを示しており、マダニの *ATG8* 遺伝子発現解析は、オートファジーのモニタリング法の一つとして利用可能であることが示唆された。

④未吸血時の中腸細胞内にはオートファゴソームが観察され(図 1: 矢印は隔離膜、矢頭はオートファゴソームを示す)、この中腸細胞内には脂肪が蓄積されていた(図 2: パネル A、赤色は細胞内の脂肪を示す)。飢餓時のマダニは中腸内に脂肪を貯蔵しているとともに、中腸上皮細胞内ではオートファジーが誘導されることが明らかになった。したがって、マダニの中腸におけるオートファジーの間接的検出法の一つとして脂肪染色が有用であると考えられた。一方、ショウジョウバエで利用されているリソソーム検出法はマダニ中腸には適さないことが判明した。

⑤以上のことから、*HLATG8*/H1Atg8 の遺伝子・タンパク質レベルでの発現解析だけでなく、オートファゴソームの観察、脂肪の検出等を行い、それらの結果を統合することによって、飢餓時のマダニにおけるオートファジーをモニタリングすることが可能であると考えられた。

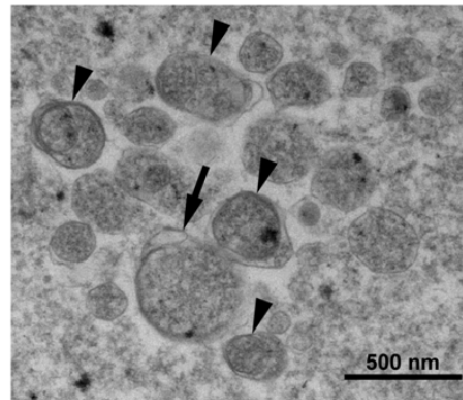


図1 マダニ中腸細胞質内のオートファゴソーム

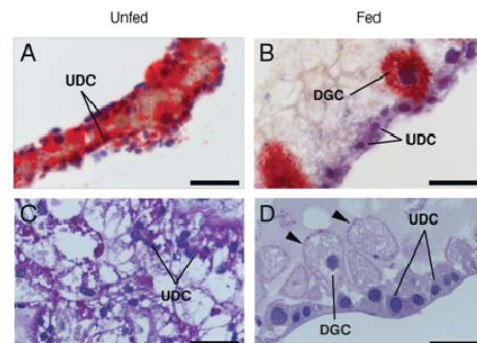


図2 マダニ中腸における脂質および糖の検出

(3) マダニ ATG 遺伝子群/Atg タンパク質群の機能解析

① RNAi により未吸血マダニの *H1ATG* 遺伝子群 (*H1ATG3*, *H1ATG4*, *H1ATG6*, *H1ATG8*, *H1ATG12*) の発現抑制を行った。リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析では、RNAi 処理後 2 ヶ月までいずれの *H1ATG* 遺伝子についても発現が抑制されたことが明らかになった。未吸血マダニにおける RNAi による遺伝子発現抑制実験、ならびに、遺伝子発現抑制効果が 2 ヶ月間という長期にわたって持続されるという実験結果は、これまで国内外において報告が無く、非常にインパクトのある所見である。なお、実験群のマダニにおいて寿命が短縮する傾向にあった。

② オートファジー阻害剤 3-MA 処理によって、実験群のマダニの寿命が短縮し、その処理マダニでは *H1Atg8* の発現パターンが変化した (図 3 : 3-MA 処理後に form I が増加し、form II は減少した。)。したがって、上記 4. (3) ①の結果と併せると、飢餓時のマダニは、オートファジーを活用して栄養分の補給を行い、飢餓に耐えていると考えられた。

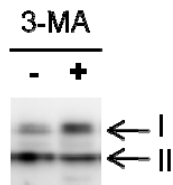


図3 マダニにおけるH1Atg8の検出

(4) マダニオートファジーの制御因子の同定

① *TOR* 遺伝子断片 (約 5 kbp) の塩基配列を決定することができたが、5' 末端の配列をすべて決定するには至らなかった。

② 現時点までに決定した *TOR* 塩基配列 (*HITOR*) を基にプライマーをデザインし、リアルタイム PCR 法により、マダニにおける遺伝子発現解析を行った。*HITOR* は唾液腺、中腸、脂肪体では吸血後に発現増大し、飽血後にその発現が低下した。卵巣では、*HITOR* の発現は未吸血時に高く、吸血後に低下したが、飽血後にその発現は増大し、飽血後 2 週間目にはピークに達した。

③ *HITOR* 遺伝子の発現抑制を行ったところ、卵黄タンパク質 (ピテロジェニン ; Vg) をコードする遺伝子 (*Vg*) の発現が下方調節され、*TOR* の基質である *S6K* がリン酸化されなかった。さらに、*Vg* 転写活性因子の発現も低下した。

④ *TOR* 阻害剤を未吸血マダニに注入したところ、注入後に *H1Atg* タンパク質の発現が増大し、マダニにおいても *TOR* がオートファジーを制御することが示唆された。

⑤ *TOR* 阻害剤を飽血マダニに注入したところ、

上記 4. (4) ③の *HITOR* RNAi の結果と同様に、*Vg* 合成の低下が見られた。

⑥ 以上のことから、雌成ダニにおいては、*TOR* が未吸血時に不活化しているためにオートファジーが活性化し、その一方で、吸血時には *TOR* が活性化し *Vg* 合成を盛んに行い、オートファジーが抑制されている可能性が示唆された。今後、マダニにおける *TOR* ならびに *Vg* 合成とオートファジーの関連性の詳細を明らかにすることが必要であると考えられた。

(5) マダニの飢餓期における糖・脂質代謝の解析

① 図 2 に示すように、未吸血時にほとんどの中腸上皮細胞内に脂肪が蓄積されていたのに対し、吸血時には一部の細胞内だけに脂肪が蓄積されていた (パネル A・B)。また、未吸血時にほとんどの中腸全体で PAS 陽性だったが、吸血時には糖衣で覆われている刷子縁だけが PAS 陽性を示した (パネル C・D、矢頭)。したがって、飢餓時には中腸内に糖と脂質が蓄積することは明らかだが、代謝とオートファジーの関連性は明らかでない。

② 代謝調節因子の一つ、AMP キナーゼの相同遺伝子をフタトゲチマダニ EST データベースを用いて単離した。今後は、その特性解明を行い、飢餓マダニにおける代謝とオートファジーとの関連性を詳細に解析する予定である。

(6) 本研究の成果は、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すことを世界で初めて明らかにしたものであり、未吸血時のマダニに対する防除法の開発に有用な知見であると考えられる。

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 8 件)

- ① Umemiya-Shirafuji R, Matsuo T, Liao M, Boldbaatar D, Battur B, Suzuki H, Fujisaki K, Increased expression of *ATG* genes during nonfeeding periods in the tick *Haemaphysalis longicornis*, *Autophagy*, 査読有, 6 巻, 2010, 473-481
- ② Malagoli D, Abdalla FC, Cao Y, Feng Q, Fujisaki K, Gregorc A, Matsuo T, Nezis IP, Papassideri IS, Sass M, Silva-Zacarin EC, Tettamanti G, Umemiya-Shirafuji R, *Autophagy and its physiological relevance in arthropods: current knowledge and perspectives*, *Autophagy*, 査読有, 6 巻, 2010, 575-588

[学会発表] (計 16 件)

- ① 白藤(梅宮) 梨可、松尾智英、川野 優、Damdinsuren Boldbaatar、田仲哲也、藤崎幸蔵、マダニにおけるオートファジーの役割、第 151 回日本獣医学会学術集会、2011 年 3 月 31 日、東京農工大学 (東京都)
- ② 白藤(梅宮) 梨可、Damdinsuren Boldbaatar、田仲哲也、藤崎幸蔵、TOR 経路はフタトゲチマダニのピテロジェニン合成に必須である、第 63 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 60 回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会、2010 年 11 月 6 日、鹿児島大学 (鹿児島県)
- ③ 白藤(梅宮) 梨可、Damdinsuren Boldbaatar、田仲哲也、藤崎幸蔵、フタトゲチマダニのピテロジェニン合成における TOR 経路の役割、第 150 回日本獣医学会学術集会、2010 年 9 月 18 日、帯広畜産大学 (北海道)
- ④ 白藤(梅宮) 梨可、Damdinsuren Boldbaatar、Min Liao、藤崎幸蔵、フタトゲチマダニ TOR 様遺伝子発現抑制による vitellogenesis への影響、第 79 回日本寄生虫学会大会、2010 年 5 月 21 日、旭川市大雪クリスタルホール (北海道)
- ⑤ 白藤(梅宮) 梨可、Damdinsuren Boldbaatar、Min Liao、藤崎幸蔵、RNA 干渉法によるフタトゲチマダニ TOR 様遺伝子の発現抑制、第 149 回日本獣医学会学術集会、2010 年 3 月 28 日、日本獣医生命科学大学 (東京都)
- ⑥ 白藤梨可、松尾智英、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・同定と発現解析、第 17 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー、2009 年 6 月 13 日、多田記念大野有終会館 (福井県)
- ⑦ 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、栃木県総合文化センター (栃木県)

[その他]

ホームページ等

<http://w3vet.agri.kagoshima-u.ac.jp/V-Infection/sinkoukansen/toppage.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白藤 梨可 (SHIRAFUJI RIKA)
鹿児島大学・農学部・プロジェクト研究員
研究者番号: 00549909

(2) 連携研究者

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