

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 31日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780273

研究課題名（和文）バベシア原虫の介卵伝播に関与するマダニ発育胚の分子基盤について

研究課題名（英文）Molecular basis of the tick embryo parasitized by *Babesia* protozoa

研究代表者

八田 岳士 (HATTA TAKESHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域・研究員

研究者番号：00455304

研究成果の概要（和文）：

マダニはバベシア原虫 *Babesia gibsoni* を媒介する吸血性節足動物である。その媒介過程において、親マダニが取り込んだ原虫は卵を介し次世代の幼ダニへと移行する（介卵伝播）。本研究ではマダニを用いた原虫の介卵伝播実験系とマイクロアレイを組合せたマダニ遺伝子発現解析実験系を確立した。本研究によりマダニの生活史上、構成的に発現している遺伝子群は、原虫の感染に影響されることなく発現レベルを維持することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Tick is a hematophagous arthropod which transmits canine *Babesia* protozoa, *Babesia gibsoni*. In this, the protozoa which taken by the parental ticks during the blood-feeding, shifts to next-generation larval ticks through an egg (transovarial transmission). In this research, two experimental systems including transovarial transmission and microarray analysis were established to analyze the gene expression profile of tick embryo parasitized by *B. gibsoni*. Here, we assumed that the expression of the genes constitutively expressing in the tick might be stable even though they were infected with the parasites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：フタトゲチマダニ、*Babesia gibsoni*、バベシア原虫、介卵伝播、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

バベシア症などのマダニ媒介性原虫疾患は、その多くが人獣共通感染症として重要視されていることに加え、これらの疾患は致死的で、回復しても病原虫が慢性的に感染宿主体内に潜伏し、マダニはベクターとして、原

虫を容易に摂取・増幅し非感染動物に伝播できることから、その根絶は極めて困難となっている。マダニ媒介性原虫疾患がヒト・動物の健康と畜産業に与えている被害は、極めて甚大で、Jongejanら(2004)とNeneら(2002)は、世界の畜産がマダニとマダニ媒介性原虫

病によって蒙っている経済的被害額が、過去30年間、毎年200億米ドル以上の巨額にのぼっていることを報告している。さらに、いずれのマダニ媒介性原虫病に対しても、有効なワクチン予防法が未確立であり、ジミナゼン製剤の製造中止により治療薬も不在である。加えて殺ダニ剤依存のマダニ防圧法は、薬剤抵抗性マダニの頻出、残留薬剤による環境・食物連鎖の汚染などの問題と相まって、現行の化学的殺ダニ剤とは異なる新規のマダニとマダニ媒介性原虫病制圧技術の開発が、世界的に急務となっている。

2. 研究の目的

バベシア症の病原虫であるバベシア原虫は、マダニによって媒介される病原体の一つである。その伝播様式は、雌成ダニ吸血の際に取り込まれた原虫が、卵を介し次世代の幼ダニに移行する。原虫に感染した幼ダニが未感染宿主を吸血することによって感染環が成立するという「介卵伝播」という様式が本原虫種の生物学的特徴となっている。本伝播様式において特に重要となる雌成ダニの主要臓器は中腸及び卵巣である。これらの臓器において産生される生物活性分子(Tick-bioactive molecule: TBM)は、吸血・繁殖の恒常性を維持する重要な機能を有しており、また近年の我々が行ってきた研究によると原虫の増殖や分化をも制御していることが明らかとなってきている(Tsuji et al., 2008; Boldbaatar D et al., 2008)。しかし、一カ月を要するマダニの胚発生の期間において、病原体とマダニ宿主が卵という閉鎖環境下で共存しなければならない介卵伝播という特殊な状況において、マダニ胚がどのような代謝・生命の維持機構を有しているのか不明である。そこで、本研究はマダニの胚が有する介卵伝播を成立させる因子、すなわち介卵伝播制御分子について、原虫感染による発現応答の詳細かつ包括的な解明を図ることを主目的とした。

3. 研究の方法

(1) バベシア原虫伝播実験モデル系の開発：犬バベシア原虫 *Babesia gibsoni* (バベシア原虫) を感染させ、貧血や血色素尿などのバベシア症を発症させた実験犬に、本原虫種の媒介節足動物(ベクター)であるフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) (マダニ) 単為生殖系岡山株成ダニを吸血させた。吸血を終えた成ダニの中腸、あるいは飽血したマダニが産卵した卵における原虫感染の有無をバベシア原虫のロプトリー関連蛋白質1 (rhoptry-associated protein 1 (RAP1)) 遺伝子特異的プライマーを用いた TaqMan probe based real-time PCR assay system により検出した。また、マダニの internal

transcribed spacer region-2 (ITS2) 領域のゲノム中コピー数にて原虫 RAP-1 アンプリコンコピー数を平均化し、サンプル間の原虫感染率の比較を行った。

(2) (1) の解析システムにより、原虫が重度に感染したマダニ卵(胚発生11日目)と正常犬を吸血したマダニが産下した非感染卵(胚発生11日目)をサンプルとして、全RNAを抽出した。マダニの Expression Sequence Tag (EST) 情報をもとにマイクロアレイプローブを設計し、1万を超えるプローブを搭載したマダニアレイを作製し、上記RNAサンプルを用いてマイクロアレイ解析を行った。

(3) (2) と同様に、原虫が重度に感染した中腸と正常犬を吸血したマダニの中腸(非感染中腸)をサンプルとしたマイクロアレイ解析を行った。

(4) マダニ胚発生過程における網羅的遺伝子発現動態の解析：初期・中期・後期の各発生過程におけるマダニ胚をサンプルとして用いマイクロアレイ解析によって、各時期に特徴的な遺伝子発現パターンを解析した。

4. 研究成果

(1) バベシア原虫伝播実験モデル系を確立し、マダニベクターステージにおけるバベシア原虫の定量的検出系を構築した(平成22年度成果及び図1)。これにより、産卵開始後後期になるほど、バベシア原虫に感染した卵が産下される傾向があることが分かった。マイクロアレイ解析には、このようにして重度に感染が確認された卵をサンプルとした。

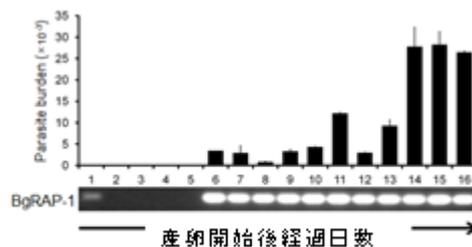
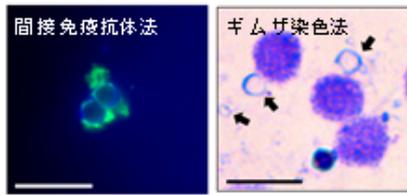


図1. *B. gibsoni* 感染卵の産下動態

(2) 図2は原虫感染卵をスライドガラス2枚で挟み押しつぶすことにより作製したクラッシュスメアー標本であり、バベシア原虫特異的抗体である抗BgP29によって染色(間接免疫蛍光抗体法)した。抗体はAlexa488によって検出しており、原虫は緑色蛍光によって示されている。このように原虫の感染が確認された感染卵および非感染卵を用いたマダニアレイ解析によるトランスクリプトーム比較解析の結果、原虫感染によって発現が2倍以上あるいは0.5倍以下に変動するマダニ胚で発現する遺伝子が複数検出されたが、有意差(FDR補正值)は認められなかつ

た（平成 22 年度成果）。



緑：原虫蛋白質、青：原虫細胞核、矢印：原虫

図 2. マダニ卵中 *B. gibsoni* 原虫の検出

(3) 同様に、原虫感染中腸および非感染中腸を用いたマダニアレイ解析によるトランスクリプトーム比較解析の結果においても、原虫感染によって発現が 2 倍以上あるいは 0.5 倍以下に変動する遺伝子が複数検出されたが、有意差 (FDR 補正值) は認められなかった (平成 23 年度成果)。

(4) マイクロアレイの有用性を再検討する目的で行ったマダニ胚のマイクロアレイ解析の結果、発生段階の遺伝子発現動態を明らかにした。胚発生は、マダニ制御対策を行う上で唯一、基盤的知見が不足しているステージであり、本解析によるデータマイニングやリアルタイム PCR の結果、胚発生中期において特異的に発現が上昇する遺伝子を複数同定することができ、特に胚発生特異的なプロテアーゼインヒビター遺伝子等を同定することができた。(平成 24 年度成果)

(5) 本研究で作製したマイクロアレイは、マダニの臓器別 cDNA ライブラリーのランダムシーケンス解析により構築した大規模 Expression Sequence Tags (ESTs) の情報をもとにデザインしたプローブを搭載している。これらの ESTs は、マダニの吸血生理や胚発生に関連した恒常性維持の責任遺伝子が数多く含まれていることがこれまでの研究により明らかとなっている。例えば、血液消化に関連する 6 種類のタンパク質分解酵素群 {①H1SP (serine protease, 至適 pH4-7; Miyoshi et al., 2007), ②Longepsin (aspartic protease, pH3.5; Boldbaatar et al., 2006), ③Longipain (cysteine protease, pH4-6; Tsuji et al., 2008), ④Legumain (asparaginyl endopeptidase, pH7; Alim et al., 2007), ⑤H1SCP (serine carboxypeptidase, pH6-7; Motobu et al., 2007), 及び⑥HLLAP (leucine aminopeptidase, pH8; Hatta et al., 2006, 2007, 2009, 2010)} を同定・機能解明しており、これらの分子群が中腸において一連の血液消化経路を構築していることを報告した。このような遺伝子プローブを搭載したマイクロアレイは、マダニの生理代謝の恒常性に関連する遺伝子発現の変化を計測するデバイスとして有効であり、実際に本研究で行ったマダニ胚のマイクロアレイ解析において

実証された。一方で、これら TBM の遺伝子発現量は原虫感染時においても平時と大差がないという実験的事実を踏まえると、TBM は原虫感染状態においても、生理代謝の恒常性維持を保つべくその発現量を維持していることが考えられる。従って、バベシア原虫伝播阻止ワクチン等の新規マダニ媒介感染症制御技術の開発にあたって、これまでに明らかとなっている TBM ではなく、原虫感染により特異的に誘導 (induce) される遺伝子から、マダニ体内の原虫の生存と存続に必須となる遺伝子や分子を標的とするような、抜本的な戦略転換が必要なのである。

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 2 件)

- ① Hatta T, Miyoshi T, Matsubayashi M, Islam MK, Alim MA, Anisuzzaman, Yamaji K, Fujisaki K, Tsuji N. Semi-artificial mouse skin membrane feeding technique for adult tick, *Haemaphysalis longicornis*. Parasit Vectors. 2012 Nov 15;5:263. doi: 10.1186/1756-3305-5-263. 査読有。
- ② Hatta T, Matsubayashi M, Miyoshi T, Islam K, Alim MA, Anisuzzaman, Yamaji K, Fujisaki K, Tsuji N. Quantitative PCR-based parasite burden estimation of *Babesia gibsoni* in the vector tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae), fed on an experimentally infected dog. J Vet Med Sci. 2013 Jan 31;75(1):1-6. Epub 2012 Aug 10. 査読有。

[学会発表] (計 5 件)

- ① 八田岳士ら、「人工吸血法により作出したバベシア原虫感染マダニ中腸 mRNA-seq 解析」第 82 回日本寄生虫学会大会、2013 年 03 月 29 日～2013 年 03 月 31 日、東京医科歯科大学
- ② 八田岳士ら、「人工吸血法により作出したバベシア原虫感染マダニ中腸 mRNA-seq 解析」第 72 回日本寄生虫学会東日本支部会・第 10 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2012 年 10 月 12 日～2012 年 10 月 13 日、群馬大学
- ③ 八田岳士ら、「フタトゲチマダニ人工吸血系の確立と *Babesia ovata* 感染マダニ作出への応用」第 154 回日本獣医学会学術集会、2012 年 09 月 14 日～2012 年 09 月 16 日、岩手大学
- ④ Hatta et al. Hypothetical coexistence strategies of *Babesia* protozoa and vector ticks: the relationship between

a parasite burden and the
blood-digestion in the tick midgut.
VIIth International Conference on
Ticks and Tick-borne Pathogens.
2011, 8, 29-30. Zaragoza, Spain.

- ⑤ 八田岳士ら、「バベシア原虫の介卵伝播に
関与するマダニ発育胚の分子基盤につい
て」第9回分子寄生虫・マラリア研究フ
ォーラム、2010年10月8日、長崎大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八田 岳士 (HATTA TAKESHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究
領域・研究員

研究者番号：00455304