

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 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22880044

研究課題名（和文） マダニ宿主探知プロセスに関与する分子基盤の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular basis of tick host detection process.

研究代表者

山地 佳代子 (YAMAJI KAYOKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・草地管理研究領域・研究員

研究者番号：40554275

研究成果の概要（和文）：本研究課題にて *Haemaphysalis longicornis* より単離した分子(HIOr)は7回膜貫通型構造を保持する可能性が示唆され、昆虫で既に単離されている嗅覚レセプターに相同性を示した。HIOrの遺伝子発現組織をRT-PCRにて解析した結果、ハラー氏器官がある第1脚において発現が確認されたが、第2~4脚では検出されなかった。また、鉗角、中腸および唾液腺においても発現が確認されたため、嗅覚レセプター以外の機能も持つ可能性も示唆された。さらに免疫組織蛍光抗体法によるHIOrのマダニ体内における局在の特定では、ハラー氏器官において陽性反応が検出された。次に新規嗅覚関連遺伝子の同定を行うため、ハラー氏器官をターゲットとした次世代シーケンス解析を実施した結果、いくつかの候補遺伝子の断片が確認された。これまでマダニでは嗅覚レセプターはほとんど報告されていないことから、本研究成果はマダニ宿主探知プロセスの解明に向けた有力な成果であるといえる。

研究成果の概要（英文）：We report here the molecular characterization and possible function of the odorant receptor (termed HIOr) identified in the haller's organ of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. The HIOr was found to be expressed at highest levels in haller's organ, chelicera, midgut and salivary gland of *H. longicornis*. Immunolocalization studies detected the endogenous HIOr in the haller's organ of an adult tick. Furthermore, the new candidate gene associated with olfaction was identified by the next generation sequencing approaches.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

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・宿主探知プロセス・ハラー氏器官

1. 研究開始当初の背景

畜産業におけるマダニの被害は、牛だけでも毎年100億米ドル以上の経済損失が発生し、その対策は急務となっている。マダニは、ウイルス・細菌・原虫・リケッチア等を家畜に媒介し、ピロプラズマ症などのマダニ媒介性

疾患を発症させるだけではなく、吸血により家畜に貧血・搔痒等の多大なストレスを与えることから、国際共通認識になったアニマルウェルフェアの観点からも、その防圧の重要性は世界的に極めて高い。また日本においては、近年、労働時間の短縮・飼養コスト低減

などの理由から放牧が注目されているが、特に放牧牛では舎飼牛よりもマダニとの接触率は格段に高まるとみられる。加えて、現行の薬剤によるマダニの防圧法は、食品への薬剤残留汚染や薬剤耐性マダニの出現などの問題が顕在化しており、安全性を考慮した有効な駆除対策が希求されている。これら諸問題を打破した新規マダニ防除技術の開発は国内外における畜産振興において必須であり、畜産分野において多面的な研究を行っていくことは極めて重要である。

マダニを含む吸血性節足動物の宿主探知行動には嗅覚系による環境内の事象の認識、そしてその刺激の適切な筋反応への転換が含まれる。そこで嗅覚系の合図の知覚を改変または遮断することによって、推定可能な方法で宿主付着行動を変化させることができることから、嗅覚系の研究は以前より注目されていた。

特に近年、最も宿主探知の研究が進んでいる蚊において、宿主探知プロセスには炭酸ガスの感知だけではなく、嗅覚器に格納されている嗅覚受容神経 (olfactory receptor neurons, ORNs) や嗅覚レセプター (odorant receptors, ORs)、嗅覚感覚器の受容器リンパ中に存在する匂い物質結合タンパク (odorant-binding proteins, OBPs) の働きによる宿主の匂い成分の感知が必須であることが報告された。また OBP 結合成分を探索することにより、ノナールやトリメチルアミン、蚊産卵誘引フェロモン (MPO) などの成分によって蚊が誘引されることが明らかとなり、蚊の防除対策の開発への応用展開が期待されている。

一方、マダニでは誘引効果をもつフェロモンやカイロモンは報告されているが、ORs などを用いた宿主探知プロセスはほとんど報告されていない。申請者はこの点に着目し昨年、日本優占種である *H. longicornis* より ORs 遺伝子のホモログ: *H. longicornis* odorant receptor (HIOr) を同定した。HIOr も蚊と同様、マダニ宿主探知を支える分子の可能性が示唆される。また、マダニにおいて未同定の ORNs や ORs、OBPs には吸血行動の引き金となっている分子が存在するものと想定される。

本研究課題ではこの様な背景を受け、未解明である HIOr の嗅覚系への関与を検証するとともに、マダニ嗅覚器官であるハラー器官の cDNA ライブラリーを作製し、嗅覚系に関与する候補分子を見出すことにより、誘引物質を利用したトラップ作製や、嗅覚レセプターの阻害によるマダニの宿主探知阻害剤などの画期的な防除法の開発へ貢献することを

目指す。

2. 研究の目的

家畜に最も甚大な被害を引き起こす外部寄生虫はマダニである。マダニは嗅覚器官を用いて宿主探知を行うことから、嗅覚系の情報伝達を阻害・遮断または攪乱することにより宿主への付着を未然に防ぐことができる。しかし、マダニ嗅覚器官での宿主探知プロセスを支える分子基盤はほとんど知られていない。

そこで本研究課題ではフタトゲチマダニ *H. longicornis* より単離した嗅覚レセプター (HIOr) の機能を、分子・細胞生物学的手法にて検証する。同時に *H. longicornis* 嗅覚器官 (ハラー氏器官) の RNA を精製後、次世代シーケンス解析を推し進め、嗅覚系に関わる候補分子を新規に見出すことにより、マダニ宿主探知プロセスの解明に向けた基盤形成を行い、畜産業でのマダニ人為的制御へ役立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *H. longicornis* より単離した嗅覚レセプター (HIOr) の解析は全く行われていないことから、HIOr の嗅覚系への関与を推測するため、分子・細胞生物学的手法を用いて検証した。推測される HIOr の cDNA 塩基配列およびアミノ酸配列を決定後、BlastX によりホモロジー検索を実施した。

(2) HIOr の遺伝子発現組織の特定は、成ダニの第 1 脚、第 2 脚、第 3 脚、第 4 脚、中腸、唾液腺、鉋角から抽出した RNA を基に cDNA 合成を行い、RT-PCR を用いて検証した。

(3) HIOr のマダニ体内における局在を検討するため、HIOr の抗血清の作製を実施した。推測されるアミノ酸配列を基に合成したペプチドをマウス 5 匹に免疫を行い、最終免疫から 3 日後に ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) およびイムノブロットによって高い抗体価と高い精製率が得られた抗血清のみを使用した。4% paraformaldehyde にて固定した成ダニ (未吸血) の切片を 10% Goat serum にてブロッキングした後、作製した HIOr 抗血清とインキュベートを行った。次いで、green fluorescence-labeled mouse IgG secondary antibody [Alexa Fluor488 goat anti mouse IgG (H+L) (Invitrogen)] とインキュベート後、蛍光顕微鏡下にて HIOr のマダニ体内における局在を可視化した。

(4) 成ダニ 1000 匹から回収したハラー氏器官 (ただし本研究では全過程を通して第 1 肢足

根を含めハラール氏器官と省略する)の全RNAを抽出後、poly(A)-RNA 精製を行い、イルミナ社 Genome Analyzer IIx を用いて次世代シーケンス解析を実施することにより嗅覚系に関連する新規遺伝子群を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1)HIOr の cDNA 塩基配列およびアミノ酸配列を解析した結果、昆虫で既に報告されている嗅覚レセプターに相同性を示し (図 1)、7 回膜貫通型構造を保持していることが確認された(図 2)。

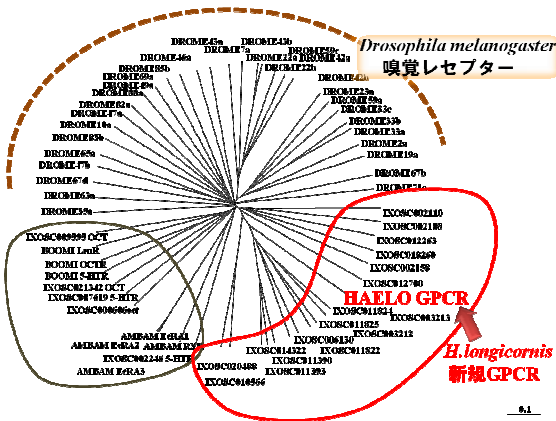


図 1 系統樹による HIOr の解析

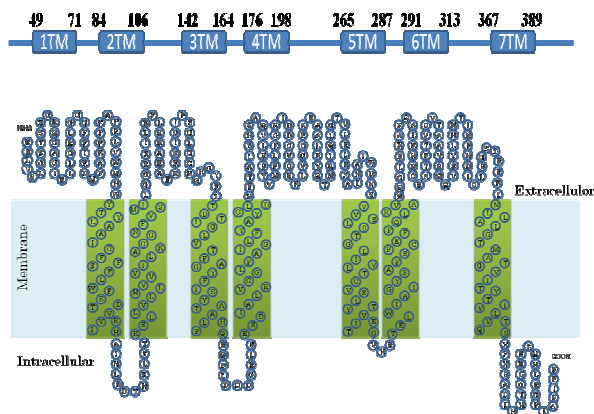


図 2 HIOr のドメイン解析

(2)RT-PCR による HIOr 遺伝子発現組織解析では第 2 脚、第 3 脚、第 4 脚では発現が確認されなかったのに対して、第 1 脚および触角、中腸、唾液腺において発現が確認された(図 3)。

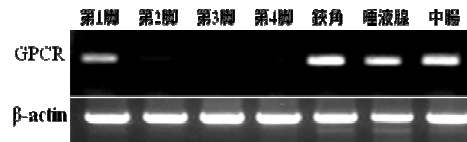


図 3 HIOr 遺伝子発現組織解析

(3)免疫組織化学蛍光抗体法による HIOr の局在の解析では、成ダニ第 1 脚にあるハラール氏器官にて局在することが明らかとなった(図 4)。

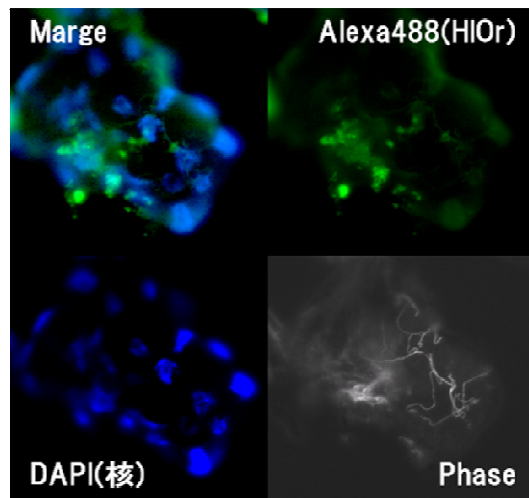


図 4 マダニ体内における HIOr の局在

(4)次世代シーケンス解析の結果、これまで蚊やハエ等において報告されている嗅覚関連遺伝子に相同性を持つ遺伝子断片と、7 回膜貫通型配列を保持する遺伝子を単離することができた。

以上の結果から、まず単離した HIOr は 7 回膜貫通型を保持し、マダニハラール氏器官で発現する嗅覚レセプターである可能性が示唆される。しかし、宿主探知にどのように貢献しているのかについては不明であり、今後更に HIOr の機能について検討していく必要がある。

また次世代シーケンス解析によって得た嗅覚関連遺伝子の断片については、現在も解析を実施しており、今後、これらの分子機能が明らかになることによりマダニの宿主探知

プロセスの解明の一助と成り得るものとかんがえている。本研究課題により得た成果は、ほとんど未解明であるマダニ宿主探知プロセスの解明に向けた今後の研究展開に重要な意義を有する成果と思われる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

山地佳代子、芳賀聡、石崎宏、マダニ宿主探知プロセスに関与する候補分子の検証、第 63 回日本衛生動物学会大会、2011.04.15、国立感染症研究所 (東京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山地 佳代子 (YAMAJI KAYOKO)

独立行政法人農業・食品産業総合研究機構・畜産草地研究所・草地管理研究領域・研究員

研究者番号：40554275