

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006-2008  
 課題番号：18390130  
 研究課題名（和文） トランスジェニックカを用いたハマダラカ-マラリア原虫の寄生適応性の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of parasitic adaptability between malaria parasite-anopheline mosquito using transgenic mosquitoes  
 研究代表者  
 吉田 栄人（YOSHIDA SHIGETO）  
 自治医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：10296121

## 研究成果の概要：

当該研究は、国内で唯一、世界でも五指に入るハマダラカトランスジェニック技術のメリットを最大限に発揮し、1) マラリア非媒介蚊の作製、2) マラリア原虫の蚊唾液腺への侵入メカニズムの解明、3) RNA 干渉法を用いた唾液タンパクの機能解析、4) 蚊によるワクチネーション、5) 環境適応性、を立案・実施し、ハマダラカ-マラリア原虫の寄生適応性解明、マラリアコントロール等々包括的な研究を推進する。

Elucidation of parasitic adaptability between malaria parasite-anopheline mosquito using transgenic mosquitoes

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2007 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	9,900,000	2,970,000	12,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：マラリア、ハマダラカ、昆虫

## 1. 研究開始当初の背景

2000 年、イギリスのグループが世界に先駆けて GFP 遺伝子を導入した” 光る ” トランスジェニックハマダラカの作製に成功した。それ以来、マラリアベクターコントロールの新しい戦略として、ハマダラカの遺伝子操作、すなわちマラリア非媒介蚊の作製が注目を集めているが、未だヒトマラリア非媒介蚊

の作製には成功していない。2002 年、マラリア原虫、ハマダラカの全ゲノム DNA 配列が解読された。トランスジェニックカの研究は、このゲノム情報によりさらに加速されると予想される。

## 2. 研究の目的

トランスジェニックハマダラカ作製技術を用い、ハマダラカ-マラリア原虫の寄生適応

性を解明する。

1. マラリア原虫は、ハマダラカに吸血されると受精を始めるが、この受精にはハマダラカ中腸内の環境が適しており、他の蚊ではマラリア原虫は分化・増殖することはできない。ハマダラカ中腸内の環境を変えることにより、マラリア原虫を伝搬しないトランスジェニックハマダラカの作製を行う。
2. 蚊は吸血する際、末梢血管を探り当てるために幾度となくプロービングとよばれる刺入出行動を繰り返す。同時に唾液を分泌し、この唾液中に含まれる血管拡張因子で血管の感知を容易にし、また血液凝固阻害因子で血液が固まることなく吸血できるようにしていると考えられている。実際、ハマダラカ唾液腺のホモジネートにはこれらの物質が含まれていることが示されているが、個々の分子についてはほとんど解明されていない。我々はマラリア媒介蚊であるハマダラカの唾液腺とマラリア原虫との関係を調べる目的で、ハマダラカの唾液腺タンパクの解析を行った。
3. ハマダラカ唾液腺はマラリア原虫のスポロゾイトが集積する重要な器官であり、吸血により唾液とともにスポロゾイトが宿主へ侵入するいわば蚊のステージのマラリア原虫の最終居住地である。スポロゾイトと関わりの深い唾液腺に外来遺伝子を発現する系を開発することは、ハマダラカマラリア原虫の生物学的適応のメカニズムを解明する重要な技術となると考えられてきたが成功には至っていなかった。
3. 研究の方法
1. トランスジェニックハマダラカに導入する分子は、ナマコ的一种であるグミから単離されたレクチン CEL-III である。CEL-III は強い血液凝集・溶血活性をもつ分子であり、マラリア原虫がハマダラカ中腸内に入ってきたタイミングに合わせて CEL-III を中腸内に分泌できればマラリア感染赤血球が凝集・溶血を起こし、受精を完遂できず、ライフサイクルを断ち切ることができると期待された。
2. ハマダラカのメスの唾液腺に特異的に発現している新規タンパク Anopheles Anti-Platelet Aggregation Protein (AAPP) を発見した。AAPP は唾液腺に豊富に発現していることから、大腸菌発現

系を用いて組換え AAPP タンパクを調製し、血小板機能、血液凝固に対する作用を検討した。

3. 唾液タンパクの発現をコントロールするプロモーター領域を用いて DsRed 遺伝子を連結し、トランスジェニック蚊を2種類（細胞内型、分泌型）作製し、その発現形態を観察する。
4. 研究成果
1. CEL-III トランスジェニックハマダラカを作製し、*P. berghei* 感染ラットを吸血させた。10 日後に中腸を解剖して、オオシスト数をカウントし、コントロールハマダラカと比較した結果、オオシスト形成数が有意に低下し、伝搬阻止率が 91%に達した。さらにヒト熱帯熱マラリア原虫に対しても増殖阻止効果が確認された。今までに報告されているマラリア非媒介トランスジェニックの効果はネズミマラリアに限定されており、実際のマラリアベクターコントロールには新たなトランスジェニック作製が必要と考えられていた。CEL-III トランスジェニックは、すべてのヒトマラリア原虫株・種に有効であると予想され、CEL-III トランスジェニックはマラリアベクターコントロールとして大いに期待される。
2. AAPP は血液凝固に対して作用を示さなかったが、コラーゲン刺激血小板凝集を濃度依存的に強度に阻害した。一方、その他の血小板凝集のアゴニストである ADP、エピネフリン、U-46619、A23187 刺激に対しては影響をおよぼさなかったことから、コラーゲン刺激に特異的な阻害作用を有していることが明らかとなった。AAPP のコラーゲン刺激血小板凝集メカニズムは、AAPP がコラーゲンに直接結合し、その結果コラーゲンが血小板へ接着することをブロックすることであった。さらにラットに AAPP を静脈内投与したところ、コラーゲン刺激の *ex vivo* 血小板凝集を投与量依存的に著しく抑制した。以上の結果より、AAPP はハマダラカの吸血行動において重要な役割を果たしていることが示唆されるだけでなく、新規抗血栓薬として開発できる可能性を有すると考えられる。またハマダラカの発生状況からマラリア感染の広がりを予測する新たな手段に成りうると期待される。
3. ハマダラカ唾液タンパクの発現をコントロールするプロモーター領域を用い

てDsRed 遺伝子を連結し、Genetic Manipulated (GM) 蚊を2種類(細胞内型、分泌型)作製した。得られたGM成虫メスの唾液腺は、側葉遠位部特異的に非常に強い赤色蛍光が検出された。また細胞内型と分泌型は全く対照的な発現パターンを示し、分泌型は唾液腺 Duct にDsRed が蓄積されていた。蚊の唾液腺に外来遺伝子を発現、分泌することに成功した初めての報告であり、唾液腺-マラリア原虫の相互作用の研究およびマラリア原虫を伝播しないハマダラカの作製等々の様々な研究が可能となる。特に側葉遠位部特異的に外来遺伝子を発現できたことは今後、マラリア原虫を含む病原体の唾液腺侵入機構解明に重要な手段となると期待される。さらに唾液腺に侵入した GFP マラリア原虫を 3D 共焦点顕微鏡でとらえることに成功した。

#### 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. Yoshida S, Kawasaki M, Hariguchi N, Hirota K, Matsumoto M.: A Baculovirus Dual Expression System-based malaria vaccine induces strong protection against *Plasmodium berghei* sporozoite challenge in mice. *Infect Immun* 77:1782-9, 2009. (査読有)
2. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 2009, in press (査読有)
3. Yoshida S, Sudo T, Niimi M, Tao L, Sun B, Kambayashi J, Watanabe H, Enjou L, Matsuoka H.: Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* 111:2007-14, 2008. (査読有)
4. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using SCID-PBL/hu mouse models. *Vaccine* 25:3038-40, 2007. (査読有)
5. Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Fukamizu R, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Matsumoto M, McMurray D, Cruz D, Tan E, Abalus R, Burgos J, Gelber R, Sakatani M.: Evaluation of a novel vaccine (HVJ-liposome/HSP65 DNA+IL-12 DNA) against tuberculosis using the cynomolgus monkey model of TB. *Vaccine* 25:2990-3, 2007. (査読有)
6. Yoshida S, Shimada Y, Kondoh D, Kouzuma Y, Ghosh AK, Jacobs-Lorena M, Sinden RE.: Hemolytic C-type lectin CEL-III from sea cucumber expressed in transgenic mosquitoes impairs malaria parasite development. *PLoS Pathog* 3:1962-9, 2007. (査読有)
7. Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JSM, Chen P-J, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS coronavirus using mouse and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv Exp Med Biol* 581:561-6, 2006. (査読有)
8. Yoshida S & Watanabe H.: Robust salivary gland-specific transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol Biol* 15:403-10, 2006. (査読有)

[学会発表] (計 2 5 件)

1. 山本大介、南雲浩志、吉田栄人：唾液中に外来遺伝子産物を発現するトランスジェニックハマダラカの解析。第53回日本応用動物昆虫学会大会(2009.3.28-30.)札幌
2. 山本大介、南雲浩志、吉田栄人：サンショウバエ唾液タンパクを発現するトランスジェニックハマダラカの作製。第78回日本寄生虫学会大会(2009.3.27-28.)東京。
3. 吉田栄人、周藤俊樹、新美正史、Bing Sun、Lian Tao、上林純一、石井明、松岡裕之、南雲浩志：ハマダラカ唾液タンパク AAPP の生化学的解析とマラリア疫学調査への応用。第78回日本寄生虫学会大会(2009.3.27-28.)東京。
4. Yoshida S & Watanabe H：Establishment of robust salivary gland-specific expression in transgenic anopheline mosquito. XVII th International Congress for Tropical Medicine and Malaria (2008.9.30-10.3) Jeju, Korea.
5. 吉田栄人：「感染症征服のための新たな挑戦」トランスジェニック蚊を用いたマラリアコントロールに向けての新規戦略。平成20年度日本生化学学会九州支部例会(2008.5.17-18.)博多
6. 荒木一美、吉田栄人：新規マラリア MSP-1 ワクチンの開発-アジュバントフリーの経鼻ワクチンで100%感染防御(P. yoeliiモデル)-。第77回日本寄生虫学会大会(2008.4.2-4.)長崎。
7. 周藤俊樹、吉田栄人、嶋田陽平、松岡裕之、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久、石井明：ハマダラカ唾液に含まれる抗血小板凝集因子 AAPP の発見。第77回日本寄生虫学会大会(2008.4.2-4.)長崎。
8. 吉田栄人、嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、Eappen G. Abraham、Marcelo Jacobs-Lorena、Robert E. Sinden：海洋生物由来のレクチン CEL-III を発現する遺伝子操作蚊はマラリア伝播を阻止。第77回日本寄生虫学会大会(2008.4.2-4.)長崎。
9. 周藤俊樹、吉田栄人、松岡裕之、嶋田陽平、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久：ハマダラカ唾液腺からの抗血小板因子 AAPP の発見。第81回日本薬理学会(2008.3.18-20.)横浜。
10. 吉田栄人：遺伝子操作蚊を用いたハマダラカーマラリア原虫の寄生適応性の解明 -マラリアコントロールに向けての新規戦略-。第48回日本熱帯医学学会特別講演(2007.10.12-13)大分。
11. 荒木一美、吉田栄人：ネズミマラリア原虫(*Plasmodium yoelii*)のmerozoite surface protein-1<sub>9</sub>をウイルスベリオン上に提示した組換えバキュロウイルスのワクチン効果。第48回日本熱帯医学学会(2007.10.12-13.)大分。
12. Yoshida S：Generation of genetically engineered mosquitoes refractory to malaria parasites - Challenge for malaria control through the genetic manipulation of its vector-. International Congress of Insect Biotechnology & Industry (2007.8.19-24.) Tegue, Korea.
13. Yoshida S, Sudo T, Watanabe H, Luo E, Matsuoka H, Ishii A：An inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. EMBO WORKSHOP 2007 "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors" (2007.7.13-20.) Crete, Greece.
14. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、Eappen G. Abraham、Marcelo Jacobs-Lorena、Robert E. Sinden、吉田栄人：海洋生物由来のレクチン CEL-III を発現する遺伝子操作蚊のマラリア伝播阻止効果。第76回日本寄生虫学会(2007.3.29-30.)大阪。
15. 吉田栄人、周藤俊樹、松岡裕之、嶋田陽平、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久：ハマダラカ唾液に含まれる抗血小板凝集活性を有する Anopheles Anti-Platelet

- Aggregation Protein。第 59 回日本衛生動物学会 (2007. 3. 29-30.) 大阪。
16. 周藤俊樹、吉田栄人、松岡裕之、嶋田陽平、川崎昌則、長村芳恵、林秀樹、問可和之、山田能久：ハマダラカ唾液腺からの抗血小板因子 AAPP の発見。第 29 回日本血栓止血学会 (2006) 宇都宮。
17. 吉田栄人：遺伝子操作蚊を用いた病原体-蚊の寄生適応性解明 -マalaria コントロールに向けての新規戦略-：独立行政法人 農業生物資源研究所主催公開シンポジウム「昆虫科学研究の未来 -昆虫を学ぶ、昆虫に学ぶ-」(2006. 11. 18.) 東京。
18. 吉田栄人、嶋田陽平、渡辺裕之：スロロゾイトの蚊唾液腺侵入メカニズム解明に向けてのアプローチ-唾液腺特異的に赤色蛍光タンパクを発現するトランスジェニックハマダラカ。第 5 回分子寄生虫・マalaria 研究フォーラム (2006. 10. 29.) 東京。
19. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：海洋生物由来のレクチンを発現するトランスジェニックハマダラカのマalaria 伝播阻止効果。第 5 回分子寄生虫・マalaria 研究フォーラム (2006. 10. 29.) 東京。
20. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：海洋生物由来のレクチン CEL-III を発現するトランスジェニックハマダラカのマalaria 伝播阻止効果。第 58 回日本衛生動物学会東日本支部大会 (2006) 栃木。
21. 荒木一美、吉田栄人：ネズミマalaria 原虫 (*Plasmodium berghei*) merozoite surface protein 1 をウイルスベリオン上に提示した組換えバキュロウィルスのワクチン効果。第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006. 10. 11-13.) 長崎。
22. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田栄人：海洋生物由来のレクチンを発現する遺伝子操作蚊のマalaria 伝播阻止効果。第 47 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同大会 (2006. 10. 11-13.) 長崎。
23. 嶋田陽平、近藤大介、上妻由章、吉田
- 栄人：ナマコのレクチン CEL-III を導入した遺伝子操作蚊によるマalaria 伝播阻止。第 58 回日本衛生動物学会 (2006. 4. 6-8.) 長崎。
24. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカマalaria 原虫の寄生適応性の解明。基盤研究 (C) (企画研究調査)「感染現象のマトリックス的解明をめざす企画調査研究」シンポジウム 感染現象のマトリックス (2006) 東京。
25. 吉田栄人：トランスジェニック蚊を用いたハマダラカマalaria 原虫の寄生適応性の解明。第 50 回応用動物昆虫学会 (2006. 3. 27-29.) つくば。
- [産業財産権]  
○取得状況 (計 1 件)
- 国際特許 PCT / JP 2006 / 322417 号 「Anti-Platelet Aggregation Product」(2006 年) Yoshida S, Sudo T.
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
吉田 栄人 (YOSHIDA SHIGETO)  
自治医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：10296121
- (2) 研究分担者  
野田 博明 (NODA HIROAKI)  
独) 農業生物資源研究所・農業資源研究所・グループチームリーダー  
研究者番号：40343991
- 上妻 由章 (KOUZUMA YOSHIAKI)  
茨城大学・農学部・准教授  
研究者番号：10284556