

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：10105

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22355

研究課題名（和文）殺ベクター型原虫による病原体媒介蚊制御法の開発

研究課題名（英文）Vector mosquito control by vector killing protozoan parasite

研究代表者

福本 晋也（Fukumoto, Shinya）

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：50376422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：殺ハマダラカ活性を持つヴェノムのスクリーニングの結果、電位依存性ナトリウムチャンネルオープナーのサソリ由来毒素Tf2の同定に成功した。次に我々はTf2遺伝子導入組換えマラリア原虫の作出に成功した。Tf2発現マラリア原虫の殺ハマダラカ活性は当初の我々の期待を満たすものでは無かった。しかしながら、Tf2発現マラリア原虫はスポロゾイト形成能を持つがマウスへの感染性を欠損し、この原虫は100%の感染防御免疫をマウスに誘導することが確認された。以上の結果からヴェノム遺伝子導入原虫は新たな概念によるマラリアワクチンとして極めて有用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蚊はTop deadliest animalとして知られ、最も多くの人間を死に至らしめている生物である。本研究では毒素遺伝子を導入した組換え原虫により蚊を制御することを目指し基礎的研究を実施した。本来の目的である蚊の殺滅には期待通りの活性を示さなかったものの、毒素遺伝子組換え原虫により100%のネズミマラリア原虫感染防御免疫を誘導することに成功した。この結果は本研究による方法論が全く新たなマラリアワクチンとして有用であることを示す重要な知見を示すものであり、今後、マラリアの征圧に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We screened for a venom with mosquito-killing activity and identified the scorpion-derived toxin Tf2, a voltage-gated sodium channel opener. We next succeeded in generating transgenic Plasmodium parasites for Tf2, but the mosquito-killing activity of Tf2-expressing parasite did not meet our initial expectations. However, the Tf2-expressing parasite has the ability to form sporozoites but lacks infectivity in mice, and the parasite induces 100% protective immunity in mice. These results indicate that the venom-transgenic parasite is extremely useful as a new concept of malaria vaccine.

研究分野：獣医学

キーワード：マラリア ハマダラカ ヴェノム

1. 研究開始当初の背景

ピレスロイドに代表される化学殺虫剤はベクター昆虫への対策主体であるが、生態系への影響など種々の問題を抱えている。蚊に代表されるベクター昆虫による病原体の伝播が1800年代終盤に発見されて以来、病原体を媒介するベクターへの対策は公衆衛生上の至上命題である。その発見から100余年のあいだ、ベクター対策法は変わることなく殺虫剤に依存している。しかしながら昨今、農業害虫への利用も含め、既存の殺虫剤使用に種々の問題が浮上している。殺虫剤抵抗性変異の出現、標的外生物への生態学的問題、ヒトの不妊に代表される哺乳動物毒性などである。そこで近年、新たな害虫防除論の提唱が望まれている。

近年、着目されているベクター・害虫対策手法として囮誘引法がある。これは囮に吸血昆虫を誘引しヒトを刺咬から防ぐ方法である。蚊などの吸血昆虫は、二酸化炭素・熱・匂いなどを誘引源として動物を認識し吸血する。これらの誘引源を人為的に導入した囮動物や血液バッグを吸血させ蚊の刺咬からヒトを守る手法が研究されている。

一方、生物由来製剤として近年着目されているのが、クモやサソリなどの昆虫捕食生物由来の天然毒ヴェノムである。数百万年にわたる進化の過程において、ヴェノムは捕食のために標的への高い親和性を手にしたペプチドである。したがって、既存のケミカル殺虫剤とは異なる物性から、環境への負荷が低いことが利点としてあげられる。遺伝子工学技術による作物へのヴェノム遺伝子導入、人工合成等により、次世代型殺虫成分として実用化へ向けた研究がなされている。

ベクターと病原体の関係で特徴的な現象が、宿主特異性である。病原体の伝播は吸血行動による機械的な移動によるものではなく、ベクター体内での複雑な分化・増殖プロセスの結果としてもたらされる。すなわち、病原体とベクターの間には固有の二者関係である宿主特異性が生まれる。そこで応募者はこの点に着目し、標的とするベクターに感染する病原体にヴェノムを発現させ、これを囮誘引法などの応用によりベクターに感染させることで、病原体が作り出すヴェノムの働きによりベクターを殺滅可能なのではとの着想に至った。

2. 研究の目的

ベクター媒介性感染症制圧の歴史を紐解くと、その成功はベクター対策の成否に大きく依存することがわかる。その主体は殺虫剤によるものであるが、耐性昆虫の出現などの諸問題により標準法としての存在が危ぶまれてきている。そこで近年、次世代の殺虫分子として、天敵昆虫や昆虫寄生菌から分離された生物由来分子の利用が模索されている。しかしながら高額な合成コストや散布法など、実用化への問題が山積している。

そこで本研究ではベクターと病原体間に存在する“宿主特異性”の逆利用により、標的とするベクターに感染する病原体にヴェノムを導入、標的ベクター昆虫のみを特異的に殺滅する、全く新たな概念に基づく病原体媒介ベクター制御法の開発に向けた基盤的知見の入手を目的として研究を行うこととした。

3. 研究の方法

殺ハマダラカ活性を持つヴェノムとして、ミツバチ由来ヴェノム Melittin (Mel) の報告があるが類する情報は極めて少ないため、優れた殺ハマダラカ活性を持つヴェノムを明らかにすることが必要である。また、ヴェノムの作用機序は Mel と同様の細胞膜に対するポアフォーミング、各種チャネルに対する阻害作用など多様である。しかしながら、どの様な作用機序のヴェノムが高い殺ハマダラカ活性を持つのかは不明である。そこで本研究ではまず、作用機序が明らかでない既知のヴェノムに着目し、どのようなヴェノムがハマダラカの防除に有効なのかを検証した。

使用したヴェノムは以下のとおりである。*Tityus fasciolatus* 由来ヴェノム Tf2 (分子量 6954, STT-050, Almone labs, Jerusalem, Israel) (Camargos et al., 2015), Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao* 由来ヴェノム Jingzhaotoxin-XI (Jtx, 分子量 3726, STJ-400, Almone labs) (Tao et al., 2016), giant yellow Israeli scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* 由来ヴェノム Chlorotoxin (Ctx, 分子量 3996, RTC-450, Almone labs) (DeBin and Strichartz, 1991), *Grammostola spatulata* spider 由来ヴェノム Voltage sensor toxin 3 (Vtx, 分子量 4172, STT-350, Almone labs) (Ruta and MacKinnon, 2004), Togo starburst tarantula (*Heteroscodra maculata*) 由来ヴェノム Hm3a (Hm3, 分子量 4287.1, STH-250, Almone labs) (Er et al., 2017), South American Tarantula spider *Grammostola spatulate* 由来ヴェノム -Grammotoxin SIA (Gtx, 分子量 4109.7, G-450, Almone labs) (Lampe et al., 1993), scorpion *Scorpio Maurus palmatus* 由来ヴェノム Maurotoxin (Mtx, 分子量 3612, STM-340, Almone labs) (Kharrat et al., 1997) および、陽性コントロールとして Mel (分子量 2846.46, M2272, Sigma Aldrich St Louis, MO, USA) (Carter et al., 2013) を使用した。ヴェノムのハマダラカ毒性評価はマイクロインジェクション法により行った。インジェクショ

ンニードルはガラスキャピラリー (GD-1, NARISHIGE, Tokyo, Japan) から プーラー (PC-10, NARISHIGE) を用いて作製した。スクリーニング実験では各ヴェノムを PBS で 50 μ M に希釈後、130 nI を電動マイクロインジェクター (IM300, NARISHIGE) を用いてハマダラカ気門前域に投与した。1 群あたり 30 匹のハマダラカを使用した。陰性コントロール群には同量の PBS を投与した。投与後 7 日間、24 時間毎に生存率を評価した。スクリーニングで毒性を示したヴェノムについては 50 μ M から 2 段階階希釈した後に 130 nI を投与し、最小有効濃度を算定した。最も高い毒性を示したヴェノムについては投与後 1 日後の生存率に基づきハマダラカに対する LD₅₀ の解析を行った。

最も高い殺ハマダラカ活性を示した Tf2 に着目し、ヴェノムを発現する組換えネズミマラリア原虫の作出を試みた。Tf2 および MeI をネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* のサーカムスポロゾイト遺伝子プロモーター支配下で発現する組換え *P. berghei* の作出を行った。組換えヴェノム発現コンストラクトの作製においては、ヴェノム遺伝子は人工合成によりネズミマラリア原虫コドンユースに最適化した。得られた組換え原虫について蚊への感染実験を行い、ベクター内の各感染ステージにおけるヴェノム遺伝子の転写をリアルタイム PCR 法により解析した。またハマダラカに感染させ、感染後のハマダラカ生存率のモニタリングを行った。また組換え原虫感染蚊の唾液腺よりスポロゾイトを精製、マウスへの投与実験を行い哺乳動物宿主への感染性を評価した。また、感染性評価に用いたマウスに対し野生型ネズミマラリア原虫スポロゾイトを感染させることで、ヴェノム発現組換えマラリア原虫による感染防御免疫誘導効果を解析した。感染防御効果の測定は末梢血パラシテミアの測定による感染の定性試験により行った。

4. 研究成果

ヴェノムスクリーニングの結果、Tf2, Hm3, Ctx および陽性コントロールの MeI 投与群が PBS 投与群と比較し有意に低い生存率を示した (Fig. 1)。投与 1 日後の生存率は、それぞれ Tf2: 16.7%, Hm3: 43.3%, Ctx: 43.3%, MeI: 30.0%であった。Vtx, Gtx, Mtx, Jtx 投与群では有意差は認められず、投与 1 日後の生存率は順に 86.6%, 83.3%, 96.7%, 96.6%であった。陰性コントロールである PBS 投与群の生存率は 96.7%であった。

スクリーニングで有意差が認められた Tf2, Hm3, Ctx の中で最もハマダラカ毒性の高いヴェノムは何かを検討・評価した。陰性コントロールは PBS, 陽性コントロールは MeI 投与群を用い、12.5, 25 及び 50 μ M の各ヴェノムをハマダラカに投与して最小有効濃度の算定を行った。その結果、Hm3 投与群の生存率は 50 μ M のみで有意に低下したが、Tf2 および Ctx 投与群の生存率は共に最小濃度 12.5 μ M で有意に低下した。最小濃度 12.5 μ M 投与 1 日後の Tf2 および Ctx 投与群の生存率はそれぞれ 16.7% および 66.7% であり、Tf2 投与群がより低い生存率を示した。

Tf2 の最小有効濃度を算定するため、さらに 0.125, 1.25, 3.3 および 6.6 μ M の投与実験を行ったところ、6.6 μ M 投与群の生存率が有意に低下した。Tf2 の最小有効濃度と陽性コントロール MeI の最小有効濃度を比較するため、MeI の最小有効濃度を求めると 30 μ M であった。以上の結果より Tf2 が陽性コントロールの MeI を含めたヴェノムの中で最も高いハマダラカ毒性を示すことがわかった。

そこで、Tf2 の毒性を数値的に評価するために Tf2 投与 1 日後の半数致死量 (Lethal Dose 50%; LD50) を調べた。一個体あたり 0.01 pmol から 10 pmol の範囲で Tf2 を投与すると、LD50 は約 0.59 pmol (4.1 ng)/個体であるとわかった。この値は今まで知られているヴェノムの中で毒性が最も強い可能性を示唆している。

Tf2 は電位依存性ナトリウムチャネル (Nav) のサブタイプである Nav1.3 の開放持続作用を持つことが報告されている。本研究において観察された Tf2 による殺ハマダラカ活性は Nav の持続開放によって惹起された神経毒性作用によるものと示唆された。Tf2 をハマダラカにインジェクションした際、麻酔下のハマダラカが羽を激しくバタつかせ回転を行う様子が観察された。これは、Tf2 によってハマダラカ神経系の過興奮作用が誘導されていることを示唆する現象であった。殺虫剤として使用されるピレスロイドも神経軸索 Nav の開放持続作用を持ち、即効性のノックダウン効果を示す。このように Tf2 はピレスロイドと類似した作用機序によって、ハマダラカに対して即効性の神経症状と殺ハマダラカ活性を呈しているものと推測された。ピレスロイドと同様の作用機序を持つヴェノムが高い毒性を示したことは、本研究で行ったスクリーニングの妥当性を担保するものであった。今後、ハマダラカに対してさらに高い毒性を示すヴェノムを探索する場合、Nav 開放持続作用が指標の一つになると考えられる。また、本研究で使用したヴェノムのうち Tf2 に加えて有意に高い殺ハマダラカ活性を示したのは、Ctx と Hm3 であった。Ctx は塩素イオンチャネルインヒビター、Hm3 は酸感受性イオンチャネルへの作用を持つことが報告されている。今後、これらのチャネルに対する作用を持つヴェノム群についても、殺ハマダラカ活性の評価を行う価値があると考えられる。

一方、本研究で使用したヴェノムの内、殺ハマダラカ活性を示さなかったヴェノムは Jtx,

Vtx, Gtx, および Mtx であった。機能はそれぞれ, Nav および電位依存性カリウムチャンネル(Kv) インヒビター, Nav インヒビター, 電位依存性カルシウムチャンネルインヒビター(Lampe et al., 1993), カルシウム依存性カリウムチャンネルおよび Kv インヒビターである。これらの各チャンネルに対するインヒビターが殺ハマダラカ活性を示さなかったことは, カチオンチャンネルインヒビターが殺虫効果の誘導には不向きな可能性, およびヴェノムの特徴の一つでもある高い標的選択性によってもたらされた可能性等が考えられ, 今後の更なる検証が必要である。

ベクターステージ特異的プロモーターを使用しヴェノム発現組換えマラリア原虫を作製し, ハマダラカへの感染実験を行った。マラリア原虫赤内期および生殖母胎産生能などは野生型原虫と有意な差は示さず, 正常な感染性を有することが確認された。中腸ステージ, 唾液腺ステージの感染性を解析した結果, 唾液腺ステージの数が野生型原虫と比較し減少することが確認された。

Me1 発現マラリア原虫をハマダラカに感染させ, 殺ハマダラカ活性を測定したところ, 野生型原虫と比較しハマダラカの生存率が低い傾向が観察された。より高い殺ハマダラカ活性を期待し, Me1 発現マラリア原虫の殺ハマダラカ活性を解析した。その結果, 有意な殺ハマダラカ活性の上昇は認められなかった。そこでヴェノム遺伝子の転写を解析した。転写は確認されたものの, ヴェノム発現に使用したプロモーターであるサーカムスポロゾイト遺伝子と比較したところ, 有意に転写レベルが低いことが確認された。また, サーカムスポロゾイト遺伝子プロモーターの外来挿入時活性を確認するため赤色蛍光タンパクを同プロモーター支配下で発現する組換えマラリア原虫を作製しプロモーターコンストラクトの正常性の確認を行った。その結果, 野生型と同様に高いプロモーター活性を示し, 中腸ステージ, 唾液腺ステージで正常に機能することが確認された。以上の結果から, ハマダラカ体内でのマラリア原虫における Tf2 の発現はなんらかの抑制機構が生じていることが明らかとなった。他種プロモーターの使用などを検討したが, 転写・発現抑制の問題を回避する手段を同定するには至らなかった。

転写・発現抑制の問題回避に関する解析のなかで副次的成果としてマラリア原虫グリオキサラゼが蚊からマウスへの感染に重要な機能を持つことを明らかにした。グリオキサラゼ系は, 解糖による細胞毒性副産物であるメチルグリオキサールの解毒経路として, ユビキタスに存在している。がん細胞などの活発に増殖する細胞は, そのエネルギー代謝を解糖に依存している。そのため, グリオキサラゼ系は抗がん剤の標的として評価されている。マラリア原虫の感染ステージであるスポロゾイトは, 肝細胞内で活発に増殖し, 2-3 日で数千個のメロゾイトを生成する。これが哺乳類宿主への感染の第一段階である。このマラリア原虫の肝細胞内での活発な増殖期には, グリオキサラゼ系が重要な役割を担っていると思われる。マラリア原虫は, グリオキサラゼと Glol1 様タンパク質からなるグリオキサラゼ系を細胞質およびアピコプラストに保有している。細胞質グリオキサラゼ II (cg1ol1) ノックアウト, アピコプラスト標的グリオキサラゼ glol1 (tglol1) ノックアウト, cg1ol1 と tglol1 ダブルノックアウト寄生体を作成し, その表現型解析を実施した。その結果, cg1ol1 および tglol1 のノックアウト寄生体には異常が見られなかった。一方, cg1ol1 および tglol1 ダブルノックアウト寄生体では, 生体内で肝臓段階の増殖が約 90%抑制されていることが観察された。これらの結果は, グリオキサラゼ系は必須ではないものの, 肝細胞における寄生虫の増殖に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに, この結果は, 細胞質グリオキサラゼ経路とアピコプラストグリオキサラゼ経路の間に補完的な関係があることを示している。寄生虫は, がん細胞で見られるようなシステムを利用して, 肝細胞での急速な増殖を可能にしていることが予想され, このプロセスは, マラリア予防のための新しい戦略開発のターゲットとなる可能性があることが確認された。

Tf2 発現原虫感染によりハマダラカの生存率が有意に低下しなかったものの, Tf2 遺伝子を低レベルではあるが発現しているにも関わらず唾液腺スポロゾイトが野生型原虫と比較し現象するものの正常に形成されることが確認された。この Tf2 発現マラリア原虫スポロゾイトのマウスへの感染性の評価を行った。その結果, 一般的なスポロゾイト投与量ではマウスへの感染が成立しないことが明らかとなった。すなわち, この組換えマラリア原虫ではスポロゾイト形成までは進行するものの, そのスポロゾイトはマウスへの感染性という観点からは機能不全状態であることが明らかとなった。過去の研究で放射線照射処理をしたスポロゾイトが高度な防御免疫を誘導可能なことを報告している。すなわち, スポロゾイトが形成されるが感染性が無いということは極めて有用な生ワクチンとして機能することが期待される。そこで, ヴェノム発現マラリア原虫スポロゾイト投与後のマウスに野生型原虫スポロゾイトを感染させることにより感染防御効果を解析した。その結果, コントロール群の未処置マウス群は 100%感染したのに対し, ヴェノム発現マラリア原虫処置群は, 野生型マラリア原虫の投与に対し 100%の感染防御効果を示した。以上の結果から, ヴェノム遺伝子の外来的導入によりマラリア原虫のスポロゾイトの感染性を欠損させることが可能であり, このように処理したスポロゾイトは完璧なマラリア原虫感染防御免疫を誘導であることが確認された。すなわちヴェノム遺伝子導入マラ

リア原虫は次世代のマラリアワクチン開発に有用な方法論であることが明らかとなった。
い助う、本研究の将来的発展によりマラリアの制御に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Soga Akira, Shirozu Takahiro, Fukumoto Shinya	4. 巻 549
2. 論文標題 Glyoxalase pathway is required for normal liver-stage proliferation of Plasmodium berghei	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 61 ~ 66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.02.044	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Soga Akira, Shirozu Takahiro, Ko-ketsu Mami, Fukumoto Shinya	4. 巻 18
2. 論文標題 Improvement of an in vitro drug selection method for generating transgenic Plasmodium berghei parasites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12936-019-2851-6	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白水 貴大、関 信彰、曾賀 晃、福本 晋也
2. 発表標題 殺ハマダラカ活性を持つ生物由来分子のスクリーニング
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
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
---------	---------