

## 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28日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580356

研究課題名（和文） マダニの飢餓耐性および原虫媒介に関するオートファジーの役割の分子・形態学的解明

研究課題名（英文） Molecular and morphological studies on roles of autophagy in tick starvation periods and their transmission of protozoan parasites.

研究代表者

松尾 智英 (MATSUO TOMOHIDE)

鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：50383667

研究成果の概要（和文）：

魚類以外の脊椎動物に寄生し、大量吸血と共に幅広い病原微生物の媒介能を有するマダニ類が類い希な飢餓耐性を持つことから、その飢餓耐性を裏付ける能力としてオートファジーに着目して研究を行った。その結果、いくつかのオートファジー関連遺伝子がフタトゲチマダニを用いて同定され、それらは未吸血期および脱皮を行う変態期に発現していたことから、マダニ類の飢餓耐性に重要な役割を持つことが示された。

研究成果の概要（英文）：

Ticks can feed a blood meal from most vertebrates except for fish and ingest a large amount of blood from hosts. Additionally, they seem to have a unique strategy to endure the off-host state for a long period. Autophagy is induced by starvation condition and is essential for life-span extension, therefore we speculate that autophagy also occurs in ticks. Some autophagy-related genes were isolated in *Haemaphysalis longicornis*, the most dominant tick in Japanese pastures and vector of piroplasmiasis among grazing cattle, and then they were expressed during their unfed and moulting periods. It showed that autophagy plays an important role in tick survival during long starvation periods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：マダニ媒介性疾病・フタトゲチマダニ・ピロプラズマ・生存戦略・節足動物

## 1. 研究開始当初の背景

マダニ類は魚類以外の全ての脊椎動物に寄生可能な広い宿主域と特有の吸血・消化機構が可能にする長時間にわたっての大量吸血、またウイルス、リケッチア、原虫をはじめとする寄生虫などほぼ全ての病原体の伝播に関与しうる、他に類を見ない突出した病原体媒介能を持つ。さらに、マダニとマダニ媒介

性疾病によって世界の畜産が被っている経済的損失は、現在もすでにワクチンなど様々な対策が取られているにもかかわらず、過去30年間で毎年70億米ドル以上にのぼっていることである。これらの理由から、地球上に棲息する15,000種を越える吸血性節足動物の中で、マダニ類はわずか750種に過ぎない小グループであるにもかかわらず、ヒト以外

の動物では第1位、ヒトにおいても蚊に次いで第2位に重要な疾病媒介節足動物とみなされている。従って、マダニおよびマダニ媒介疾病対策はヒトを含めた動物の健康と畜産業においては不可欠であり、殺ダニ剤抵抗性マダニの頻出や残留薬剤による環境・食物連鎖の汚染などの深刻な問題と相まって、より有効な対策法の開発は今や世界的な急務である。しかし、このような重要性・緊急性にもかかわらず、同様の媒介疾病とベクターの関係におけるマラリアと蚊に関する研究に対して、マダニ類における研究は十分でなく、マダニ特有の生存戦略と前述の著しく高い疾病媒介能のメカニズムは未だ解明されていない多くの問題が残されているため、これらの解明が緊急に必要であった。

## 2. 研究の目的

疾病制圧の手段として一般的に重要視されるヒトや家畜など哺乳類宿主における病原体に関する直接的な研究と平行して、節足動物とその媒介疾病に対する対策としてのワクチンや薬剤の開発を成功させることも重要な要因となる。マダニ類において考えれば、そのためにはその生存基盤である吸血・消化および疾病媒介の成否に重要なマダニ自然免疫のメカニズム解明が重要となる。マダニ類では、他の吸血性昆虫においてみられるような消化酵素をルーメン内に分泌し、対象物を分解してから吸収する細胞外消化と異なり、消化対象物をほとんど消化せずに細胞内に取り込み、細胞内で消化を行うというマダニ類独特の「細胞内消化」とそれに伴う中腸細胞内における多様なステップをもつ消化様式、さらにはその中腸細胞を通過していかなければならない媒介原虫との関わりに焦点を当てる。すなわち、(1) マダニ類の中腸において発現しているオートファジーの機能、(2) マダニ媒介原虫は中腸の防御機構をどのように回避するのか? という視点から、第一に「消化」の抑制によるマダニ自身のコントロールを、第二にそれによる「原虫病媒介」のコントロールを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

申請者らはこれまでに飢餓状態のマダニ中腸におけるオートファジー発現を遺伝子・タンパク発現および微細・免疫形態学的に証明してきた。しかし、数年にも及ぶとされるマダニの寿命は個体差が大きく、「飢餓」の定義は複雑であるため、より長期飢餓状態のマダニを用いて詳細にその発現を追跡する。また、①作成する予定のモノクローナル抗体、および②マダニの他の遺伝子において効果が実証されている RNAi 法、をそれぞれ用いて、オートファジー抑制実験を行うことによ

り、マダニの飢餓耐性におけるオートファジーの役割を解明する。さらに、すでに申請者らはマダニ中腸における消化酵素の一つが *Babesia* 原虫媒介抑制効果を持つことを報告しており、今後はウシ放牧地における調査によってマダニの原虫感染率を把握すると共に、その野外感染個体または実験的に *Babesia* 原虫を導入した個体を用いて同様のオートファジー抑制実験を行うことによって、マダニの消化機構、特にオートファジーの原虫媒介に対する関与を明らかにする。

材 料：本研究には我が国での主要な原虫媒介種であるフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*) を供試する。本種は単為生殖系統と両性生殖系統が存在する特殊な種であり、これまで実験室で継代維持の容易な単為生殖系を用いてきた。しかしながら、実験室での継代維持が困難な両性生殖系統についても同様の研究が必要と考えるため、単為生殖系を用いた研究と平行し、本研究においては、放牧地における感染率調査および野外感染個体採集のために、すでに予備調査を行って両性生殖系統の生息地であることを確認した大分県・久住高原の放牧地を調査地として選択し、採集した個体もオートファジーに関する研究に供試する。

## 方 法

1) 長期飢餓マダニにおけるオートファジー発現追跡：これまでの研究においては、予備実験の段階からオートファジー発現が確認された成ダニ出現後3ヶ月間の未吸血期を経た個体を用いてきた。しかしながら、「飢餓」の定義は数年に及ぶとされるマダニの寿命の個体差にも関わる複雑な問題であるため、より長期、すなわち1年~2年の未吸血期を経た個体を経時的に供試して、これまで同様の RNA・タンパク発現および微細・免疫形態学的観察によって、飢餓状態の進行とオートファジー発現の関連を追跡し、より詳細なマダニの飢餓耐性におけるオートファジーの役割について解析する。長期飢餓状態マダニ個体の作出はすでに開始されているが、長期の個体維持が必要なため、必要に応じて平成23年度以降も継続していく。

2) マダニ中腸上皮細胞における消化のメカニズム：マダニ中腸における消化を包括的に解明することを目的として、すでに微細形態学的観察は開始されているが、さらに、得られた遺伝子情報や組換えタンパクを用い、モノクローナル抗体を作成して、*in situ* ハイブリダイゼーションや免疫形態学的手法を駆使し、特に中腸上皮におけるオートファジー関連 RNA または小胞の膜タンパク発現の解析を行う。また、マダニ類の他の消化酵素に関する研究も参考にし、様々なステージの個

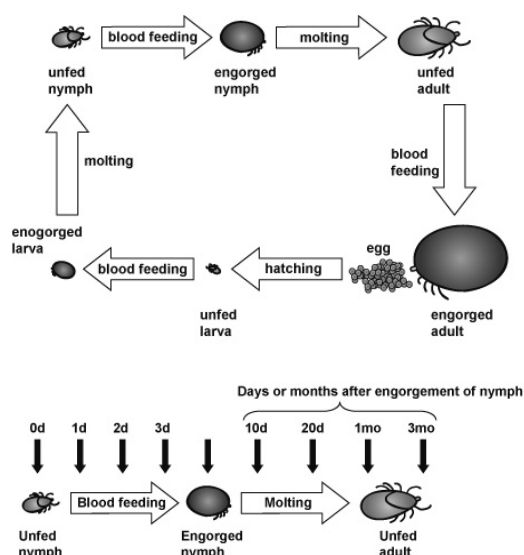
体において中腸細胞内に生じるオートファゴソームを含む多様な小胞を分類し、それらの消化における機能を分析する。下記4)の中腸における原虫の動態観察においても、消化に関わる小胞と原虫との関係を観察することで、両者の関連を示唆する結果が得られることが予想される。

3) ウシ放牧地における野外個体の原虫感染率調査・採集：実際のウシ放牧地におけるフタトゲチマダニのピロプラズマ症原因虫感染率を把握すると共に、下記の中腸における原虫の動態と原虫媒介機構におけるオートファジーの関与を解析するための感染個体採集も目的として、両性生殖系統個体生息地である大分県久住高原において本種の季節的消長のピーク期である夏期に調査を行う。採集された個体については、*Babesia/Theileria* 属原虫各種の PCR による特異的検出に実績のある帯広畜産大学の研究協力者の協力により、感染率を調べる。これによって十分な感染率が得られれば、実験感染個体と共に、各実験に野外感染個体を供試することが可能となり、感染率が高率でなくとも、ウシピロプラズマ症発生地域における有用な疫学的データとなるため、研究期間中毎年行うこととする。

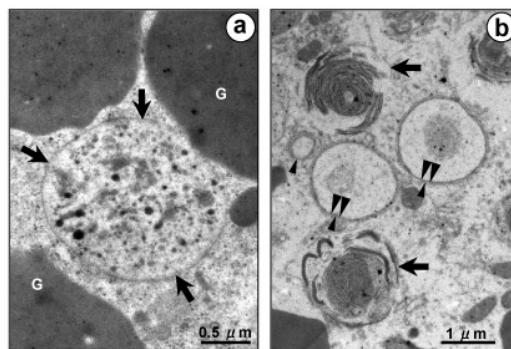
#### 4. 研究成果

多様な生物において様々な機能が報告されているオートファジーが、数年以上に及ぶ彼らの一生を数日間の吸血3回程度で生存するというマダニの特徴的な飢餓耐性を支えるために消化管上皮で機能していると考えた。研究協力機関において確立されているマダニの臓器別 EST データベースをもとに、これまでオートファジーに関わっていると考えられる重要ないくつかのホモログの発現を確認してきた。また、他の動物で示されているのと同様に ATG8 conjugation system が未吸血期のダニにおいて機能していることが示唆され、未吸血期中腸上皮細胞には脂肪やグリコーゲンの蓄積が認められ、消化器官である中腸の上皮細胞が貯蔵のためにも働いている可能性をも示してきた。これらの成果は節足動物におけるオートファジー研究の発展に大きな役割を果たしてきたことが評価され、査読付きながら研究成果に記載している multi-author review への参加依頼を受けて、マダニにおける本成果を発表するに至った。

さらに、3 宿主性のマダニであるフタトゲチマダニ (単為生殖系統) を材料として、オートファジー関連 (ATG) 遺伝子の単離を試み、これまでに ATG3、ATG4、ATG6、ATG8、ATG12 の相同遺伝子を得た (HIATG3、HIATG4、



HIATG6、HIATG8、HIATG12)。リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析では、各 HIATG 遺伝子の発現は若ダニの未吸血期と変態期 (飽血後 10 日目) において増大し、脱皮後の未吸血成ダニ (飽血後 3 ヶ月目) ではさらに増大することを明らかにしてきた。特に、HIATG8 遺伝子発現は、すべての活動性発育期 (幼・若・成ダニ期) の未吸血マダニにおいて高く、臓器別では、中腸において未吸血時に発現増大することが判明し、間接蛍光抗体法により、未吸血時の中腸上皮細胞質内に HIATg8 と HIATg12 タンパクの局在が認められ、オートファジー特有の膜構造体 (隔離膜、オートファゴソーム、オートリソソーム) の存在が電子顕微鏡を用いた観察によって確認された。



以上のように、オートファジー発現に関する一定の成果をあげ、このことはマダニの顕著な飢餓耐性に裏付けされた生存戦略に対するオートファジーの重要な位置づけを示唆する知見を提供するものであったと確信している。

ここまでは消化器官としての中腸におけるマダニ自身の「生存基盤」となる消化のメカニズムの解明し、オートファジーがマダニ類の飢餓耐性に関してどのような役割を果たしているかをテーマにした研究を行うこ

とによって、マダニ自身の防除に直接的な成果を目指した研究を行ってきた。

一方、オートファジーの発現が証明されたマダニ中腸は媒介原虫の必須の通過関門であり、原虫の通過阻止または制限において重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、実験的にマダニ体内に原虫を確実に導入することは困難であった。そこで、媒介原虫に対するオートファジーの役割を調べるために、1)牛ピロプラズマ病発生地域におけるマダニの原虫保有率を調べ、さらに2)オートファジー研究の材料として役立つことが出来るか、ということを検討することを主目的とし、さらに(3)実験室において継代維持されてきたフタトゲチマダニ特有の単為生殖系統に加え、野外両性生殖系統個体とのオートファジーや媒介原虫の動態に関する比較検討を計画していた。平成22年度に九州地方で発生した口蹄疫の影響によって野外調査の実施が困難であったため、残念ながら野外個体に関する研究を本科学研究費の助成期間中に十分進展させることはできなかった。しかしながら、最終年度である平成24年度に大分県の放牧地にて調査を実施し、マダニ個体およびその地域に放牧されている牛血液検体を採集した。現在、採集したマダニ個体および牛血液から、どの程度のピロプラズマ原虫類の保有・罹患率があるか鋭意原虫検出を試みているところである。これらの結果によって、実験的にマダニ個体に原虫を導入することの困難さを野外原虫保有個体を供試することで解決できる可能性がある。そのため、これらは纏まり次第、本研究助成の成果として本年中には報告する予定であり、併せて他のマダニ媒介病原微生物についての疫学的データも示すことが出来ると考えている。

#### 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3件)

(1) Tanaka, T., H. Maeda, T. Matsuo, D. Boldbaatar, R. Umemiya-Shirafuji, A. Kume, H. Suzuki, X. Xuan, N. Tsuji and K. Fujisaki (2012) Parasitocidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against *Toxoplasma gondii*. *Peptides* 34: 242-250.

(国外) (査読有)

DOI: 10.1016/j.peptides.2011.07.027

(2) Umemiya-Shirafuji, R., T. Matsuo, Min Liao, D. Boldbaatar, B. Battur, H. Suzuki and K. Fujisaki (2010) Increased expression of ATG genes during non-feeding periods in the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Autophagy* 6: 473-481. (国外) (査読有)

DOI: 10.4161/auto.6.4.11668

(3) Malagoli, D., F. C. Abdalla, Y. Cao, Q. Feng, K. Fujisaki, A. Gregorc, T. Matsuo, I. P. Nezis, I. S. Papassideri, M. Sass, E. C. Silva-Zacarin, G. Tettamanti and R. Umemiya-Shirafuji (2010) Autophagy and its physiological relevance in arthropods: Current knowledge and perspectives. *Autophagy* 6: 575-588. (国外) (査読有)  
DOI: 10.4161/auto.6.5.11962

[学会発表] (計6件)

(1) 白藤 (梅宮) 梨可・川野 優・Boldbaatar Damdinsuren・松尾智英・田仲哲也・藤崎幸蔵: マダニのオートファジー関連遺伝子とその役割. 第153回日本獣医学会学術集会. さいたま (2012年3月) (国内)

(2) Tanaka, T., H. Maeda, T. Matsuo, R. L. Galay, D. Boldbattar, R. Umemiya-Shirafuji, H. Suzuki, X. Xuan, N. Tsuji and Kozo Fujisaki: Parasitocidal activity of tick longicin peptide. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜 (2011. 11) (国内)

(3) Tanaka T., H. Maeda, T. Matsuo, D. Boldbattar, R. Umemiya-Shirafuji, A. Kume, H. Suzuki, X. Xuan, N. Tsuji and K. Fujisaki: Parasitocidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against *Toxoplasma gondii*. 17th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases. 奈良 (2011. 9) (国内)

(4) Matsuo, T., N. Okura, H. Kakuda and Y. Yano: Reproduction in a Metastriata tick, *Haemaphysalis longicornis*. 7th International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Spain (2011. 8) (国外)

(5) Tanaka T., H. Maeda, T. Matsuo, D. Boldbattar, R. Umemiya-Shirafuji, A. Kume, H. Suzuki, X. Xuan, N. Tsuji and K. Fujisaki: Parasitocidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin against *Toxoplasma gondii*. 7th International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens. Spain (2011. 8) (国外)

(6) 田仲哲也・前田大輝・松尾智英・Md. Morshedur Rahman・Boldbaatar Damdinsuren・白藤 (梅宮) 梨可・玄 学南・辻 尚利・藤崎幸蔵: フタトゲチマダニロンギシンP4のトキソプラズマに及ぼす影響. 第63回日本寄生虫学会南日本支部・第60回日本衛生動物学会南日本支部 合同大会. 鹿児島 (2010年11月) (国内)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾智英 (MATSUO TOMOHIDE)

鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号: 50383667

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

白藤梨可

帯広畜産大学原虫病研究センター・

助教

研究者番号：00549909