

令和元年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05633

研究課題名(和文) 病原体媒介節足動物の共生微生物ライブラリーの構築と病原体制御への応用

研究課題名(英文) Archiving of the symbionts of arthropods for controlling vector-borne diseases

研究代表者

中尾 亮 (Nakao, Ryo)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：50633955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,300,000円

研究成果の概要(和文)：マダニなどの節足動物は、病気を引き起こす病原体を体内に保有して、人や動物に伝播する。本研究では、そのような病原体媒介節足動物が他にどのような微生物の集団を保有するかを明らかにすることを目的とした。国内外で採集されたマダニを材料に、微生物由来の遺伝子を解析したところ、コクシエラやリケッチア等の特定の細菌群が優占して存在することが分かった。マダニとそれら優占細菌群の遺伝子型を比較したところ、親から子へ垂直伝播するものと、個体間で水平伝播するものの両方の存在が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マダニが保有する微生物群全体を解析することで、新規のものを含む多数の微生物の検出に成功した。それら微生物の遺伝子情報は、マダニがどのようにして微生物の助けを得ながら生存しているのかを知る鍵となる。微生物がマダニ集団内でどのように維持されているかを知ることは、マダニがどのように病原体を獲得しているのかを知ることにつながり、マダニが媒介する感染症の対策に応用できる。

研究成果の概要(英文)：Some of the arthropods such as ticks can carry pathogens to humans and animals. The present study was aimed to disclose the diverse microbiome in such vector arthropods. We found that some bacteria such as Coxiella and Rickettsia dominantly exist in ticks. Comparison between tick phylogeny and bacterial genotypes revealed that ticks have acquired the dominant bacteria via both vertical and horizontal transmission.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：節足動物 共生微生物 細菌叢 マダニ ベクター 原虫 コクシエラ リケッチア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蚊やダニなどの吸血性節足動物はヒトや動物に重篤な疾病を引き起こす様々な病原体を媒介する。節足動物媒介性感染症をより効果的に制御するためには、病原体のベクター（媒介者）である節足動物をターゲットとした対策が有効である。しかし、これまでの殺虫剤を中心とした防除法では、環境への負荷や薬剤耐性個体の出現が大きな問題となっている。

節足動物は病原体以外にも様々な微生物を体内に保有している。ある種の共生微生物の感染により、節足動物が特定の病原体（ウイルス・細菌・原虫）を保有・伝播できなくなる事例が知られている。最近ではこの現象を応用し、ハエ由来の共生微生物（ボルバキア細菌）を実験的に蚊に感染させるとデング熱ウイルスの伝播能を失い、さらにそのボルバキア感染蚊は野外で繁殖し非感染蚊を駆逐することがオーストラリアのデング熱流行地で実証された（Hoffmann et al., 2011）。この報告は、共生微生物をツールとする病原体制御法が実現可能なアプローチであることを証明する重要な発見となった。

2. 研究の目的

国内外でマダニを採集し、メタゲノム解析手法を応用することでマダニが保有する微生物叢をアーカイブ化することを第一の目的とした。さらに、主要なマダニ共生微生物の分離を試み、そのゲノム情報を整備するとともに、マダニの分子系統関係との比較から共生微生物のマダニ集団内での分布拡散様式を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マダニの採集

国内 17 都道府県約 180 地点において、植生上からフラッキング法によりマダニを採集した。マダニ乳剤を作製後、DNA および RNA を抽出した。マダニ乳剤は -80 度フリーザーで保存し、一部のサンプルは微生物分離に供した。また、ザンビア共和国、ミャンマー連邦共和国、スーダン共和国、オーストラリア、米国、フィジー共和国、ポリビア多民族国からもマダニ DNA・RNA 試料を収集した。

(2) 微生物遺伝子の検出と遺伝子型別

マダニ由来 DNA を材料に 16S リボソーム RNA 遺伝子の V3-4 超可変領域を対象とした PCR を実施した。PCR 産物はタグ配列を付加後、Illumina MiSeq での解析に供し、細菌組成情報を得た。リケッチア属細菌、コクシエラ属細菌、スピロプラズマ属細菌については、それぞれの細菌属特異的な real-time PCR および PCR にて、各細菌遺伝子の検出と遺伝子型別を行った。

(3) 節足動物細胞を用いた微生物の分離とゲノム解析

Ixodes scapularis 由来細胞 (ISE6) および *Aedes albopictus* 由来細胞 (C67/36) に、マダニ乳剤を接種して、マダニから微生物の分離試験を行った。分離された微生物は精製の後、高速シーケンサーによるショットガン解析に供し、ゲノム情報を取得した。

(4) マダニの分子系統解析

マダニミトコンドリアゲノム（ミトゲノム）の配列保存領域にプライマーを設計し、ミトゲノムの長鎖 PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物からライブラリを調整し、Illumina MiSeq により解読してミトゲノム完全長配列を取得した。

4. 研究成果

(1) マダニ保有細菌叢

16S リボソーム RNA 遺伝子の V3-4 超可変領域を対象とした菌種組成解析の結果、マダニの細菌叢は多様な分類群から成る細菌集団により構成されることが分かった。一方で、コクシエラ、リケッチア、スピロプラズマなどのマダニ個体内で優占となる細菌群の存在が明らかとなった。特にコクシエラは、ほとんどの全てのマダニ種で検出されたが、*Ixodes* 属では解析に供した 4 種のうち *Ixodes ovatus* でのみ検出された。近年、コクシエラは宿主マダニにビタミン B 群を供給する役割が報告されており、*I. ovatus* ではその役割を担う他の細菌の存在が示唆された。また、フタトゲチマダニ実験室維持株（岡山株）についても、各ステージ（卵、幼ダニ、若ダニ、成ダニ）で細菌叢を解析したところ、全てのステージでコクシエラが優占種として特定された。

(2) マダニからの微生物分離

計 200 検体（15 マダニ種）のマダニ乳剤を節足動物細胞に接種し、20 検体より細菌株が分離された。内訳は、*Rickettsia asiatica* (2 菌株)、*Rickettsia helvetica* (3 菌株)、*Rickettsia monacensis* (2 菌株)、*Rickettsia tamurae* (3 菌株)、*Rickettsia* sp. LON (2 菌株)、*Spiroplasma* sp. (4 菌株)、*Rickettsiella* sp. (2 菌株)、および *Rhabdochlamydia* sp. (2 菌株)であった。*R. tamurae*、*Spiroplasma* sp.、*Rhabdochlamydia* sp. それぞれ 1 株について全ゲノム配列を決定した。その他の菌株については、ドラフトゲノム配列を取得した。

(3) マダニ細胞に持続感染するウイルスの検出

マダニ由来の ISE6 細胞を用いて分離した微生物のゲノムを解析する過程で、ISE6 細胞に持続感染するウイルスの存在が明らかとなった。ISE6 細胞培養上清をショットガンシーケンス解析に供し、tBLASTx によりウイルス様配列のアノテーションを行ったところ、少なくとも 5 種類のウイルス配列の存在が明らかとなった(表 1)。ISE6 細胞および培養上清由来の RNA から当該ウイルス配列が検出できたものの、ISE6 細胞由来の DNA から配列が検出されなかったことから、水平伝播によりゲノムで組み込まれたウイルスエレメントではないことが推察された。

配列ID	塩基長 (bp)	ウイルス科	ウイルス名 (暫定的)	近縁配列 (アミノ酸相同性)
1	9,252	Iflaviridae	<i>Ixodes scapularis</i> iflavirus	<i>Formica exsecta</i> virus 2 (25%)
2	9,147	Bunyviridae	<i>Ixodes scapularis</i> bunyavirus, L segment	Gamboa virus (26%)
3	2,686	Unassigned	<i>Ixodes scapularis</i> associated virus-1, RdRP	<i>Ixodes scapularis</i> associated virus-1 (97%)
4	1,485	Unassigned	Unclassified virus, capsid precursor	Drosophila A virus (36%)
5	4,321	Bunyviridae	<i>Ixodes scapularis</i> bunyavirus, M segment	Whenzhou Shrimp Virus 2 (25%)

表 1. マダニ由来 ISE6 細胞で検出されたウイルス様配列

(4) マダニの分子系統解析

国内に分布するマダニ 17 種についてミトゲノム完全長配列を解読した。*Amblyomma* 属、*Haemaphysalis* 属、および *Dermacentor* 属マダニでは共通の遺伝子配置がみられ、*Ixodes* 属マダニは固有の遺伝子配置を示した。ミトゲノム上のコーディング遺伝子(15 遺伝子)に基づき系統樹解析を行った(図 1)。その結果、これまで分子分類が困難であった近縁種 (*Haemaphysalis megaspinosa* と *Haemaphysalis japonica*) も明確に区分することができ、マダニと共生菌の系統関係の詳細な比較が可能となった。さらに、北海道および本州の 5 道県で採集された *I. persulcatus* について、ミトゲノム配列に基づく集団遺伝解析を実施した。その結果、マダニ採集地と、遺伝子型には関連はみられず、本州と北海道間でマダニの移動が示唆された。

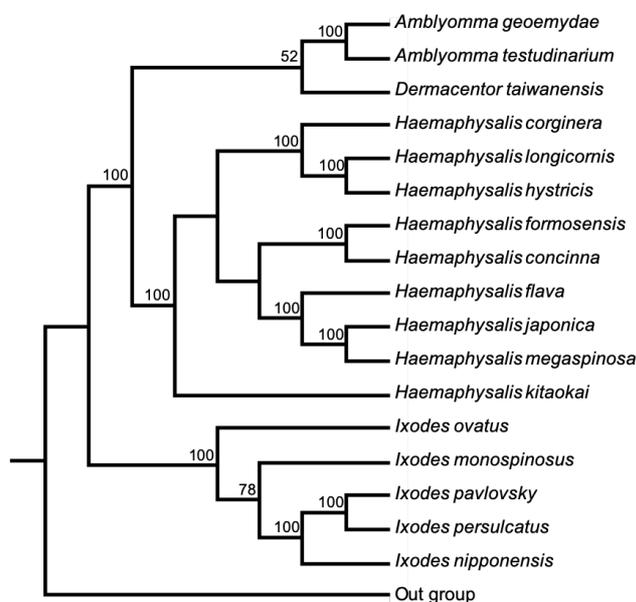


図 1. ミトゲノム・コード遺伝子に基づくマダニ分岐図 (ML法)

(5) マダニと優占細菌との系統比較

コクシエラ、リケッチア、スピロプラズマについて Multilocus sequence typing 法により遺伝子型別を行い、宿主となるマダニの系統関係と比較した。コクシエラでは宿主マダニの系統進化とおおむね一致する形で遺伝子型の分岐が見られ共生関係が安定的であることが示された。リケッチアでは、宿主特異性が高いリケッチア種・遺伝子型と多数のマダニ種によって維持されているリケッチア種・遺伝子型に大分されることが明らかとなった。一方、スピロプラズマでは全てのマダニ種が固有のスピロプラズマ種・遺伝子型を保有していたが、データベース上の他の節足動物に由来するスピロプラズマと複数のクレードを形成することから、スピロプラズマは過去にマダニと他の節足動物間で水平伝播を繰り返したことが示唆された。

< 引用文献 >

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, Cook H, Axford J, Callahan AG, Kenny N, Omodei C, McGraw EA, Ryan PA, Ritchie SA, Turelli M, O'Neill SL. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 476(7361):454-7.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Salim B, Alanazi AD, Omori R, Alyousif MS, Alanazi IO, Katakura K, Nakao R. Potential role of dogs as sentinels and reservoirs for piroplasms infecting equine and cattle

in Riyadh City, Saudi Arabia. *Acta Trop.* 2019. 193. 78-83. 査読有.
DOI: 10.1016/j.actatropica.2019.02.029.

Thu MJ, Qiu Y, Matsuno K, Kajihara M, Mori-Kajihara A, Omori R, Monma N, Chiba K, Seto J, Gokuden M, Andoh M, Oosako H, Katakura K, Takada A, Sugimoto C, Isoda N, Nakao R. Diversity of spotted fever group rickettsiae and their association with host ticks in Japan. *Sci Rep.* 2019. 9(1). 1500. 査読有.
DOI: 10.1038/s41598-018-37836-5.

Thu MJ, Qiu Y, Kataoka-Nakamura C, Sugimoto C, Katakura K, Isoda N, Nakao R. Isolation of *Rickettsia*, *Rickettsiella*, and *Spiroplasma* from questing ticks in Japan using arthropod cells. *Vector Borne Zoonotic Dis.* in press. 査読有.
DOI: 10.1089/vbz.2018.2373.

Qiu Y, Nakao R., Hang'ombe BM, Sato K, Kajihara M, Kanchela S, Changula K, Eto Y, Ndebe J, Sasaki M, Thu MJ, Takada A, Sawa H, Sugimoto C, Kawabata H. Human borreliosis caused by a new world relapsing fever *Borrelia*-like organism in the old world. *Clin Infect Dis.* in press. 査読有.
DOI: 10.1093/cid/ciy850.

Akter S, Nakao R., Imasato Y, Alam MZ, Katakura K. Potential of cell-free DNA as a screening marker for parasite infections in dog. *Genomics.* in press. 査読有.
DOI: 10.1016/j.ygeno.2018.05.020.

Salim B, Amin M, Igarashi M, Ito K, Jongejan F, Katakura K, Sugimoto C, Nakao R. Recombination and purifying and balancing selection determine the evolution of major antigenic protein 1 (*map 1*) family genes in *Ehrlichia ruminantium*. *Gene.* 2019. 683. 216-224. 査読有.
DOI: 10.1016/j.gene.2018.10.028.

Qiu Y, Kaneko C, Kajihara M, Ngonda S, Simulundu E, Muleya W, Thu MJ, Hang'ombe MB, Katakura K, Takada A, Sawa H, Simuunza M, Nakao R. Tick-borne haemoparasites and Anaplasmataceae in domestic dogs in Zambia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018. 9(4). 988-995. 査読有.
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.025.

Nakao R., Matsuno K, Qiu Y, Maruyama J, Eguchi N, Nao N, Kajihara M, Yoshii K, Sawa H, Takada A, Sugimoto C. Putative RNA viral sequences detected in an *Ixodes scapularis*-derived cell line. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017. 8(1). 103-111. 査読有.
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.10.005.

Nakao R., Abe T, Funayama S, Sugimoto C. Horizontally transferred genetic elements in the tsetse fly genome: an alignment-free clustering approach using Batch Learning Self-Organising Map (BLSOM). *Biomed Res Int.* 2016. 2016. 3164624. 査読有.
DOI: 10.1155/2016/3164624.

Nakao R., Jongejan F, Sugimoto C. Draft genome sequences of three strains of *Ehrlichia ruminantium*, a tick-borne pathogen of ruminants, isolated from Zimbabwe, The Gambia, and Ghana. *Genome Announc.* 2016. 4(3). 査読有.
DOI: 10.1128/genomeA.00453-16.

[学会発表](計72件)

中尾 亮. マダニの共生微生物から探る病原体進化. 第161回日本獣医学会学術集会. 2018年.

Thu MJ, Qiu Y, Sugimoto C, Katakura K, Isoda N, Nakao R. Isolation of endosymbionts of ticks in Japan. 第161回日本獣医学会学術集会. 2018年.

Nakao R., Sugimoto C, Katakura K. Tick symbionts: Their diversity and evolutionary relationship to the host tick. 第87回日本寄生虫学会大会. 2018年.

柿阪圭太, 中尾 亮, Thu MJ, 邱永晋, 杉本千尋, 片倉 賢. マダニから分離されたスピロプラズマの全ゲノム解析. 第160回日本獣医学会学術集会. 2017年.

Thu MJ, Qiu Y, Sugimoto C, Isoda N, Nakao R. Genetic diversity of *Rickettsia* spp. in ticks collected from Japan. 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference (TPP9). 2017年.

Nakao R., Saito A, Thu MJ, Qiu Y, Matsuno K, Sugimoto C, Katakura K. *Coxiella*-like endosymbiont as an evolutionary marker of ticks. 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference (TPP9). 2017年.

齋藤 歩, 中尾 亮, Thu MJ, 邱永晋, 松野啓太, 杉本千尋, 片倉 賢. マダニとそれに共生する *Coxiella* 属細菌の共進化機構の考察 両者の遺伝的多様性と系統学的解析より. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016年.

中尾 亮, 木下豪太, 邱永晋, 杉本千尋, 片倉 賢. ペプチド核酸を用いたマダニ保有原生生物叢解析法の開発. 第159回日本獣医学会学術集会. 2016年.

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学大学院獣医学研究院・獣医学部寄生虫学教室ホームページ

<https://www.vetmed.hokudai.ac.jp/organization/parasitol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：阿部 貴志

ローマ字氏名：(ABE, takashi)

研究協力者氏名：田仲 哲也

ローマ字氏名：(TANAKA, tetsuya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。