

令和元年9月3日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15264

研究課題名（和文）吸血性マダニをモデルとする多細胞生物遺伝子水平伝播に関する研究

研究課題名（英文）Horizontal gene transfer of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks

研究代表者

岩永 史朗（IWANAGA, Shiroh）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：20314510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマダニの唾液腺内、血管拡張物質（TAM）のゲノム配列を解析し、これが宿主動物から水平伝播したことを証明した。更にエクソン-イントロン構造解析の結果、TAMをコードするexon1とexon2は脊椎動物のアドレノメデュリン-5のexon2とexon4由来であることを示した。興味深いことに機能に無関係なexon3は完全に消失したのに対し、exon2とexon4の構造は全く変化することなく、完全に保存されていた。このことから機能に無関係なゲノムの領域は進化の過程で除去され、必要な部分は全く変化せずに残ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常、生物において遺伝情報は親から子へと受け継がれていく（遺伝子垂直伝播）。この過程で遺伝子に様々な変異が加わり、生物は漸次的に進化していく。一方、時として個体間や異種生物間で遺伝情報が偶発的に受け渡されることがあり、これを遺伝子水平伝播と呼ぶ。これまで多細胞生物においては遺伝子水平伝播が発見されておらず、その進化への影響が不明であった。本研究では宿主動物と外部寄生体（マダニ）間で遺伝子水平伝播が起こったことを証明し、その結果、新たな属の出現につながった可能性を示唆した。この成果は進化における遺伝子水平伝播の新たな意義を示すと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we conducted the genomic analysis of *Ornithodoros moubata* and indicated that salivary vasodilator molecule, tick adrenomedullin (TAM), was transferred horizontally from host animals. This analysis showed that exons 1 and 2 of TAM were derived from exon 2 and 4 of vertebrate adrenomedullin. Interestingly, the exon3 which is not responsible for vasodilating activity of vertebrate adrenomedullin was completely disappeared from tick's genome. In contrast, the structure of exons 2 and 4 are completely conserved between TAM and vertebrate adrenomedullin. These results indicated that the essential genomic structure are never changed, but the non-essential structure rapidly disappeared. The TAM is probably essential for the survival of ticks, and thus this would be a selective pressure during evolution.

研究分野：寄生虫・衛生動物学

キーワード：マダニ 進化 遺伝子水平伝播

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

通常、生物において遺伝情報は染色体の複製により母細胞から娘細胞へと受け継がれていく(遺伝子垂直伝播)。これに対し個体間や異種生物間において遺伝情報が偶発的に受け渡されることがあり、これを**遺伝子水平伝播**と呼ぶ。例えばバクテリアでは異なる種間において接合などにより遺伝情報が受け渡され、抗生物質耐性や毒素産生能などが遺伝する。よって遺伝子水平伝播はバクテリアの進化の原動力になっていると考えられている。一方、動物・植物などの多細胞生物においても遺伝子水平伝播が起こることが知られている。例えばショウジョウバエのゲノムには共生細菌のゲノムが移行しており、また寄生性双子葉植物であるストライガのゲノムには単子葉植物であるイネ科由来の遺伝子が移行していることが報告されている。しかし、これらの事実は多細胞生物において遺伝子水平伝播が起こることを示すに留まり、進化における役割に対し明確な解答を与えるものではなかった。

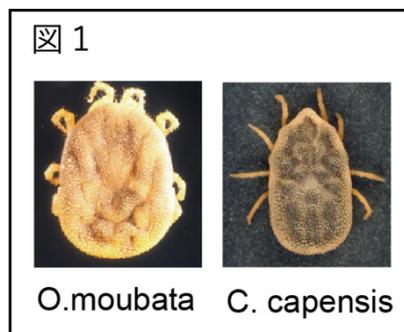
2. 研究の目的

我々はマダニの唾液腺より発見された血管拡張物質(Tick Adrenomedullin, TAM)をコードする遺伝子が吸血により宿主動物より水平伝播したことを示唆し、更にこれによりマダニにおいて新たな属が出現した可能性について示唆した。この発見はマダニの進化だけでなく、多細胞生物の進化を考える上で極めて貴重な例を与え、遺伝子水平伝播の役割を証明するものであると考える。そこで本研究では**多細胞生物での水平伝播機序の解明と進化的意義の理解を深める**ことを目的とし、*Ornithodoros* 属マダニ及び最近縁種 *Carios* 属マダニの比較ゲノム解析を試み、ゲノムレベルでの遺伝子水平伝播の機序について明らかとする。さらに、*Ornithodoros* 属マダニにおいて TAM コード領域のゲノム解析を進め、遺伝子水平伝播における配列変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) *O.moubata* と *C.capensis* のゲノム配列決定

本研究では *Ornithodoros* 属マダニとして *O.moubata* を *Carios* 属マダニとして *C.capensis* を用いる。両マダニは図 1 に示すように極めて類似した形態を持ち、進化的に最近縁関係にある。ゲノム配列決定はマダニ個体間での遺伝子配列の多型による影響を排除するために両マダニの各 1 個体より抽出したゲノム DNA を用いて行う。まずゲノム DNA を超音波破碎により断片化し、塩基長 600~1000bp の断片から PCR フリーショットガンライブラリを、塩基長 3000bp~5000bp の断片よりメイトペアライブラリを作製する。次に両ライブラリをイルミナ社 Hi-seq に供し、配列データを取得する。続いて de novo sequence assembly program を使い配列のアセンブリを実行し、両ライブラリより得られた配列情報を相補させ、スーパーコンティグ(=ドラフトゲノム配列)を構築する。本研究では TAM 周辺の解析及び新規水平伝播遺伝子探索を目的とするため、完全な全ゲノム配列は必要なく、ドラフトゲノム配列を使用して研究を実施する。



(2) TAM 遺伝子をコードするゲノム領域の解析

既に決定している TAM 遺伝子の cDNA 配列を基にオリゴ DNA を設計し、*O. moubata* ゲノム配列中の TAM 遺伝子をコードしているゲノム領域をクローニングする。次に得られた DNA 断片の配列解析を行い、TAM のゲノム内での構造を決定する。即ち、エクソン、イントロン構造について解析を進め、TAM 遺伝子が宿主動物から水平伝播した結果、配列構造が進化の過程でいかにして維持され、逆に変化してきたのかについて知見を得る。

4. 研究成果

(1) **O.moubata と C.capensis のゲノム配列決定**: まず,実験試料となる *C.capensis* の採取を行った。採取地は *Carios* 属マダニが生息していることが事前の調査で判明していた鹿児島県ハンミヤ島とした。その結果,目的とする成虫メスの *C.capensis* を合計 20 匹採取できた。次に採取した成虫メスの *C.capensis* からゲノム DNA を精製し,配列決定用の高純度 DNA の調製を行った。その際はマダニ個体間での遺伝子配列の多型による影響を排除するために両マダニの各 1 個体よりゲノム DNA を抽出した。その結果,配列決定に使用可能な純度のゲノム DNA を精製できた。続いてゲノム DNA を超音波破碎により断片化し,塩基長 600~1000bp の断片から PCR フリーショットガンライブラリを作製して,イリミナ社 Hi-seq に供し,配列データを取得した。その結果,*C.capensis* のゲノム サイズが巨大であることが判明し,デノボでのアッセンブルは極めて困難であることが判明した。そこで,cDNA に対象を変え,現在,TAM 類似物質の探索を行った。まず,*C.capensis* の唾液腺から cDNA ライブラリーを作製し,これをランダムに選択して,配列解析を行った。同時に *O. moubata* 唾液腺由来の cDNA についてもライブラリーを作製し,同様に配列解析を行い,両者を比較した。その結果,アミノ酸配列の特徴から 1) Kunitz 型 Proteinase inhibitor, 2) Lipocalin , 3) Salivary basic tail-less protein, 4) Putative salivary protein type-1, 5) Putative salivary protein type-2, 6) Vertebrate adrenomedullin (ADM)-like molecule の 6 種のタンパク質ファミリーに分類されることを明らかとした。TAM 以外の分子では *C. capensis* と *O. moubata* では共通性が見られたものの, TAM 類似物質は同定されなかった(図 2)。以上のことより, TAM は *Carios* 属マダニと *Ornithodoros* 属マダニが分岐した後に出現したものである可能性が示唆された。

(2) **TAM 遺伝子をコードするゲノム領域の解析**: TAM 遺伝子の水平伝播の痕跡を調べるために *O. moubata* ゲノムより TAM をコードする領域をクローニングし,脊椎動物の ADM 遺伝子のゲノム配列と比較した(図3)。その結果, TAM は二つのエクソンからなり,コードするアミノ酸配列からエクソン1と2はそれぞれ ADM-1 及び ADM-5 のエクソン2 及び4 と対応した。一方, ADM-1 及び ADM-5 のエクソン3 に相当するエクソンは TAM には存在していなかった。続いて TAM, ADM-1 及び ADM-5 の各エクソンとイントロンとの境界を調べたところ, TAM のエクソン1 と ADM-1 及び ADM-5 のエクソン2 では開始コドンからエクソン末端までが 86bp~99bp であること, TAM のエクソン2 と ADM-1 及び ADM-5 のエクソン4 ではエクソン末端から N 末端側のプロセッシング部位までが 16bp~22bp であることが示され, TAM と ADM-1 及び ADM-5 の間ではエクソン-イントロン構造が一致することが示された。また,このようなエクソン-イントロン構造の一致は TAM と ADM-2 の間では見いだされず,両者間のアミノ酸配列の特徴の不一致を支持する結果であった。以上の結果は TAM 遺伝子が脊椎動物の ADM-1 若しくは ADM-5 遺伝子

に由来することを強く示唆するものであり, *Ornithodoros* 属マダニが両遺伝子の何れかを水平伝播によって獲得した可能性が極めて高いことを示した。

加えて TAM と ADM-1 及び ADM-5 の間で見られる二つのプ

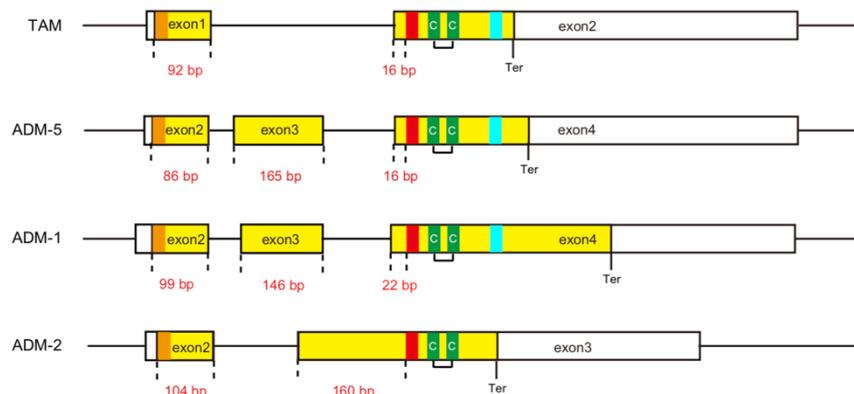


図 2 TAM と ADM のエクソン-イントロン構造

TAM と ADM のコーディング領域を黄色で示す。またシグナル配列 (橙)、プロセッシング部位 (N 末端, 赤, C 末端, 青) 及び Cys 残基 (緑) を示す。

ロセンング部位の保存性も遺伝子水平伝播を支持すると考えられた。即ち,仮にTAMが自然突然変異の集積によりADM遺伝子とは無関係に獲得されたとした場合,ADMと同様に

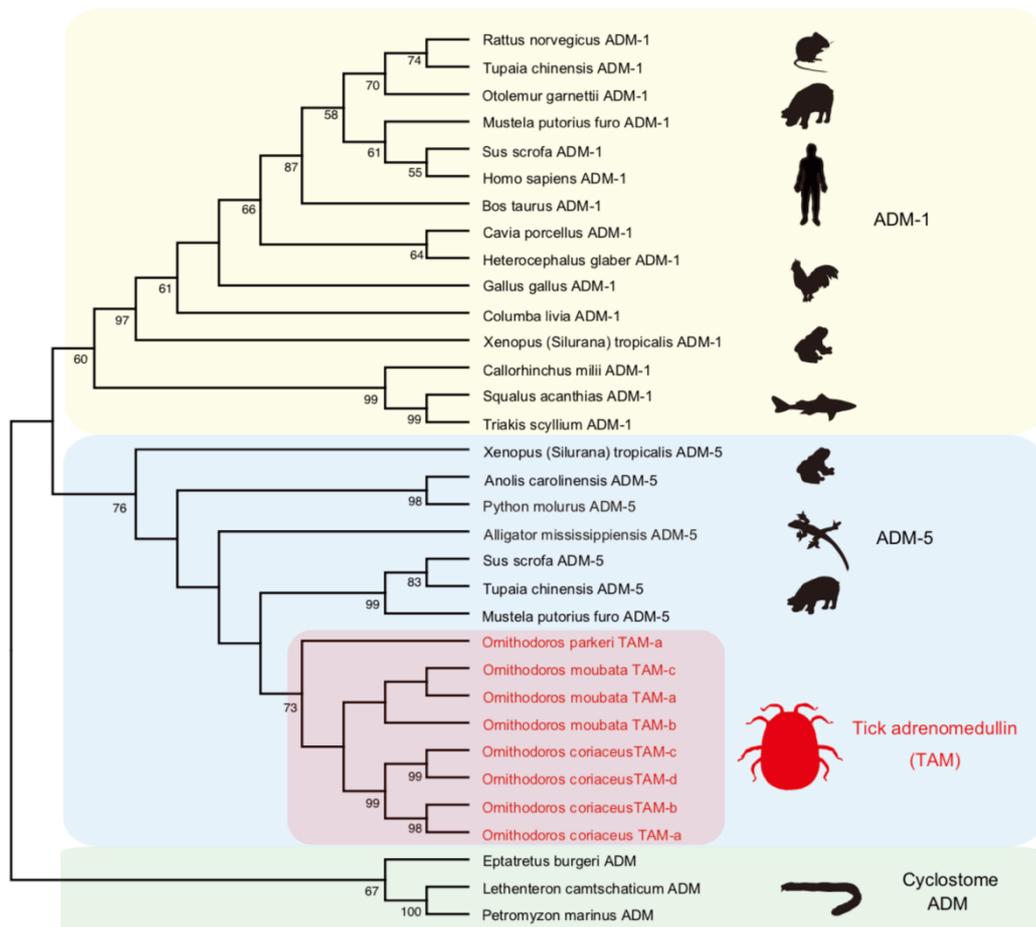


図3: TAMと脊椎動物のADMの系統樹解析

TAMと脊椎動物で報告されている全てのADM-1及びADM-5を用い、系統樹解析(最大節約法)を行った。円口類(Cyclostome)はADMのアイソフォームを持たないためADMとした。

プロセッシング部位を取って進化の過程で獲得する必要はなく,両部位の保存性と矛盾する。つまり,*Ornithodoros*属マダニがTAM遺伝子を獲得した時にはすでにプロセッシング部位は存在していたと考える方が自然であり,ADM遺伝子の水平伝播を示唆し,プロセッシング部位はTAMの活性化に不可欠であるため遺伝子水平伝播後,純化淘汰により配列が保存されたと考えられた。

またTAM遺伝子では見られないADM-1及び-5のエクソン3はプロセッシングにより活性型から除去される部分に相当し,血管拡張活性には不要である。その為,水平伝播直後には存在したが長い進化の過程で変異し,TAM遺伝子からは消失したと推定された。この結果は真核生物間で遺伝子が水平伝播した場合,その機能発現に関する部分は完全に保存され,逆に不必要な部分は完全に消失することが示唆された。

続いてADM-1及び-5の何れがTAM遺伝子の起源であるかを検討するために系統解析を行った(図3)。その結果,*Ornithodoros*属マダニは一つのクラスターを形成し,これらはADM-5と進化的に近縁であることが示された。一方,円口類のADM及び脊椎動物のADM-1のクラスターはTAMを含んでおらず,遠縁であることが示された。以上の結果よりTAM遺伝子は脊椎動物のADM-5遺伝子に由来することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

1. Kwofie K.D., Sato K., Sanjoba C., Hino A., Shimogawara R., Amoa-Bosompem M., Ayi I., Boakye D.A., Anang A.K., Chang K.S., Ohashi M., Kim H. S., Ohta N., Matsumoto Y., Iwanaga S., Oral activity of the antimalarial endoperoxide 6-(1,2,6,7-tetraoxaspiro[7.11]nonadec-4-yl)hexan-1-ol (N-251) against *Leishmania donovani* complex., *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13, 7235-7235, 2019. doi: 10.1371/journal.pntd.0007235.
2. Yamamoto K., Takahashi K., Ato M., Iwanaga S., Ohta N., Antimalarial activity of vitamin D3 (VD3) does not result from VD3-induced antimicrobial agents including nitric oxide or cathelicidin., *Experimental Parasitology*, 18, 30464-304468, 2019 doi: 10.1016/j.exppara.2019.03.005
3. Ohta T., Tilkanont T., Ayertey F., Nakagawa M., Tung N.H., Bolah P., Blagogee H., Appiah A.A., Ocloo A., Ohashi M., Tanoue K., Yamaguchi Y., Ohta N., Yamaoka S., Iwanaga S., Uto T., Shoyama Y., Establishment of a quantitative and qualitative analysis and isolation method for tetracyclic iridoids from *Morinda lucida* Benth leaves., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*, 164, 475-480, 2019. doi: 10.1016/j.jpba.2018.10.044.
4. Ayibieke A., Sato W., Mahazu S., Prah I., Addow-Thompson J., Ohashi M., Suzuki T., Iwanaga S., Ablordey A., Saito R. Molecular characterisation of the NDM-1-encoding plasmid p2189-NDM in an *Escherichia coli* ST410 clinical isolate from Ghana., *PLOS ONE*, 13, 0209623-0209623, 2018 doi: 10.1371/journal.pone.0209623.
5. Awusah B.E., Kumagai T, Yamabe M., Hino A., Shimogawara R, Kim H.S., Sato A., Ichimura K., Ayi I. ,Iwanaga S., Ohta N., Insights into the mode of action of 1,2,6,7-tetraoxaspiro [7.11] nonadecane (N-89) against adult *Schistosoma mansoni* worms., *Parasitology International.*, 67, 403-412, 2018 doi: 10.1016/j.parint.2018.03.006.
6. Payungwong T., Shinzawa N., Hino A., Nishi T., Murata Y., Yuda M., Iwanaga S., CRISPR/Cas9 system in *Plasmodium falciparum* using the centromere plasmid., *Parasitology International*, 67, 605-608, 2018 doi: 10.1016/j.parint.2018.06.002.
7. Li X., Huang J., Kaneko I., Zhang M., Iwanaga S., Yuda M., Tsuji M., A potent adjuvant effect of a CD1d-binding NKT cell ligand in human immune system mice., *Expert Rev Vaccines.*, 16, 73-80. 2017 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14760584.2017>.
8. Zhang M., Kaneko I., Tsao T., Mitchell R., Nardin E.H., Iwanaga S., Yuda M., Tsuji M. A highly infectious *Plasmodium yoelii* parasite, bearing *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein., *Malar J.*, 15, 201, 2016 doi: 10.1186/s12936-016-1248-z.
9. Iwanaga S., Horizontal gene transfer of a vertebrate vasodilatory hormone into ticks, (マダニー宿主動物間での血管拡張物質の遺伝子水平伝播) 医学の歩み., 259 巻 13 号 p.1199-1204, 2016. (<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=925913&AC=16914>)

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 岩永史朗 マダニの進化: 遺伝子水平伝搬の関与, 第 70 回日本衛生動物学会 (招待講演), 2018
2. Shiroh Iwanaga, Drug resistance in Malaria The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会) 2016.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特に無し。

6. 研究組織

(1) 研究分担者

特に無し。

(2) 研究協力者

特に無し。