

令和元年6月26日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18794

研究課題名(和文) 栄養代謝に着目したマダニ 原虫間の相互作用の解明

研究課題名(英文) Tick-protozoan parasite interactions: focusing on nutrient metabolism in ticks

研究代表者

白藤 梨可 (SHIRAFUJI, Rika)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教

研究者番号：00549909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マダニは魚類以外の脊椎動物を宿主とし、吸血時に原虫などの病原体を媒介する獣医学・医学上重要な節足動物である。本研究では、原虫感染時のマダニにおける栄養代謝に着目し、原虫感染マダニにおけるオートファジーとTarget of rapamycin (TOR) 経路関連分子の発現動態解析、標的遺伝子の発現を抑制したマダニにおける表現型解析と原虫保有・媒介能評価を実施した。その結果、原虫のマダニ卵巣への侵入あるいは感染の維持において、卵母細胞・胚の発育に必須の卵黄タンパク質前駆体(ビテロジェニン)の合成ならびに取り込みに関与する分子が重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、原虫感染マダニモデルを用い、原虫がマダニ卵巣に感染する際に重要な役割を担う分子を見出した。それらの分子は、マダニ胚の栄養源である卵黄タンパク質前駆体(ビテロジェニン)の合成と取り込みに関与する分子であり、研究開始当初の仮説の通り、マダニにおける原虫の伝播は、マダニの生命維持と繁殖の付随現象であることが明らかになった。これらの成果は、将来の原虫伝播阻止ワクチンの作製と効果実証研究へと発展させるための重要な基礎情報である。

研究成果の概要(英文)：Ticks are blood sucking arthropods and transmit various pathogens to human and animals. In this study, we focused on nutrient metabolism in protozoan parasite-infected ticks and examined the gene expression profiles of autophagy- and Target of rapamycin (TOR) pathway-related molecules in the infected ticks. We found that some genes were up-regulated or down-regulated in protozoan parasite-infected ticks. Subsequently, gene silencing mediated by RNA interference was performed to compare phenotype and infection rates of between control and knockdown ticks. As a result, it was suggested that the molecules involved in the synthesis and uptake of egg yolk protein precursor (vitellogenin), an essential molecule for oocyte / embryo development, might play an important role in the tick-protozoan parasite interactions in the ovaries.

研究分野：獣医寄生虫学・獣医衛生動物学(特にマダニ)

キーワード：マダニ 栄養シグナル伝達 原虫伝播 RNA干渉法 飢餓 飽血

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

### 1. 研究開始当初の背景

(1) マダニは、魚類以外のすべての脊椎動物を宿主とする獣医・医学上極めて重要な吸血性節足動物である。マダニの吸血による直接的加害に加え、吸血によって媒介する多種多様な病原体（原虫、リケッチア、ウイルスなど）による間接的加害がより深刻であり、畜産業に及ぼすマダニの経済的加害や人獣の公衆衛生における重要性が世界中で報告されている。

(2) 国内においては、マダニ媒介性原虫によるウシピロプラズマ病は家畜衛生上重要な放牧病の一つであり、感染・発病を阻止するワクチン・治療薬は現存しない。したがって、媒介者（ベクター）であるマダニに対する的確な防除策がピロプラズマ病コントロールの鍵を握る。その対策として主に殺ダニ剤が使用されているが、生息マダニの種や活動時期を把握した上で計画的に使用しなければ十分な防除効果を得ることができず、簡便性の高い、より効果的なマダニワクチンあるいは原虫伝播阻止ワクチンの開発が求められている。

### 2. 研究の目的

(1) マダニは脊椎動物の血液を唯一の栄養源とし、その生活史は“未吸血（飢餓）”と“飽血”で成り立っている。すなわち、数年に及ぶ生活史の大半を未吸血（飢餓状態）で過ごし、最適な宿主動物に遭遇できるまで待ち伏せする。吸血行動は、幼・若・成ダニ期に約1週間ずつ、生涯で計3回行われるだけである。吸血を終えて満腹状態（飽血）に達すると、その体重は吸血前の約100倍も増加し、雌ダニでは、獲得した栄養分のほとんどすべてを数千個もの卵の発育に利用する。産卵終了後の雌ダニはやがて死に至る。マダニと媒介原虫を制圧するためのワクチン開発を実現させるためには、上述のマダニ特有の生態を分子・細胞・個体レベルで徹底的に理解することが重要である。

(2) 申請者らはこれまでに、国内の最優占マダニ種であるフタトゲチマダニを用いて、未吸血（飢餓）と飽血時の栄養代謝に着目した研究を推進し、飢餓時にはオートファジーが、飽血時にはTarget of Rapamycin (TOR) 経路がマダニの栄養代謝の中心的役割を担うことを明らかにしてきた。そこで、マダニ特有の栄養代謝が、マダニ体内における原虫の寄生戦略（生存・分化・増殖・侵入）と不可分の関係にあるとの仮説を立て、栄養代謝に着目したマダニ原虫間の相互作用の解明を図る本研究課題を計画した。具体的には、原虫感染マダニにおけるオートファジーとTOR経路関連分子の発現動態解析、標的遺伝子発現抑制によるマダニの表現型解析と原虫保有・媒介能の評価を実施し、将来の原虫伝播阻止ワクチン開発への応用に繋げるための基礎的知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) バベシア *Babesia ovata* 感染雌ダニの作出および TOR 経路関連分子の遺伝子発現解析

Hatta et al. (2014) に従い、フタトゲチマダニ雌ダニ（岡山株；単為生殖系）にバベシア *Babesia ovata*（三宅株）感染ウシ赤血球を吸血させた。吸血を終えて飽血落下した雌ダニを回収し、インキュベーター内で飼育した。飽血後1~4日目に雌ダニを解剖し、脂肪体、卵巣、その他臓器（CA）に分けて回収した。脂肪体より抽出した total RNA より cDNA を合成し、リアルタイム PCR にて TOR 経路関連分子の遺伝子発現を解析した。また、*B. ovata* 感染評価のため、CA より抽出した DNA を鋳型とし、*B. ovata* -チューブリン特異的プライマーを用いた nested PCR を実施した。卵巣については核酸抽出の他、組織切片の作製を行い、卵巣内の卵母細胞発育ステージの分類基準の設定ならびに卵母細胞における *B. ovata* の検出を試みた。

(2) *B. ovata* 感染雌ダニにおける TOR 経路関連分子の機能解析

上記(1)の結果より、*B. ovata* 感染により発現が変動した遺伝子をピックアップし、RNA 干渉法により標的遺伝子発現抑制雌ダニを作出した。それらの雌ダニに *B. ovata* 感染ウシ赤血球を吸血させ、表現型解析と原虫保有・媒介能の評価を行った。

(3) タイレリア *Theileria orientalis* 感染マダニの作出

ウシ赤血球置換免疫不全マウスを用いたタイレリア *Theileria orientalis* 感染マダニの作出を行った。マダニ唾液腺における *T. orientalis* 検出の条件検討を実施した。

### < 引用文献 >

Hatta T, Miyoshi T, Matsubayashi M, Islam MK, Alim MA, Anisuzzaman, Yamaji K, Fujisaki K, Tsuji N. Semi-artificial mouse skin membrane feeding technique for adult tick, *Haemaphysalis longicornis*. Parasit Vectors. 2012; 5: 263. doi: 10.1186/1756-3305-5-263.

### 4. 研究成果

(1) *B. ovata* 感染雌ダニの作出

フタトゲチマダニ雌ダニ（単為生殖系）にバベシア *Babesia ovata*（三宅株）感染ウシ赤血球を吸血させた。吸血を完了（飽血）し落下した雌ダニをサンプル瓶に回収し、インキュベーター

ター内で飼育し、産卵準備期(飽血後1~4日目)に解剖した。摘出した脂肪体および卵巣より total RNA を、その他臓器を含む残骸(CA)より DNA を抽出した。CA より抽出した DNA を鋳型とし、*B. ovata* -チューブリン特異的プライマーを用いた nested PCR を実施した結果、飽血後2および4日目ともに *B. ovata* 遺伝子の増幅が認められた。さらに、一部の飽血雌ダニについては継続飼育し、産下卵を経日的に回収した。原虫感染雌ダニは非感染雌ダニと同様に産卵を行ったことから、原虫感染は雌ダニの産卵効率には影響しないことが明らかになった。次に、経日的に回収した各卵由来の DNA をテンプレートとして、上述の nested PCR を実施した結果、産卵開始後1~3日目の卵において標的遺伝子の増幅が認められた。このことから、本実験系により *B. ovata* 感染ウシ赤血球を雌ダニに吸血させることにより、原虫が卵巣内の卵母細胞に侵入し、卵母細胞が成熟卵に発達してもなお細胞内に留まる可能性が示唆された。以上のことから、卵巣における原虫とマダニの相互作用を解析するタイミングは、飽血以降~産卵開始後3日目までが妥当であることが判明した。これらの成果の一部は、Sci Rep ならびに Acta Parasitol に掲載された(発表論文 および )。

#### (2) *B. ovata* 感染雌ダニの脂肪体および卵巣における TOR 経路関連遺伝子の発現動態解析

CA サンプルを用いた nested PCR により *B. ovata* 遺伝子増幅が認められた雌ダニについて、その脂肪体および卵巣由来 total RNA を用い、Vg 合成(Akt、TOR、S6 キナーゼ、GATA、ピテロジェニン(Vg))ならびに Vg 取り込みに関与する分子(Vg 受容体(VgR)、autophagy-related gene 6(ATG6))について、リアルタイム PCR 法による遺伝子発現解析を行った。その結果、脂肪体における Vg 合成関連分子の遺伝子発現は、原虫感染雌ダニ(iRBC 群)および非感染雌ダニ(RBC 群)間で有意差が認められなかった。しかし、iRBC 群の卵巣 Vg の遺伝子発現は、RBC 群に比べ、飽血後1および2日目に有意に上昇し、3日目には低下した。VgR および ATG6 の発現については、飽血後2日目の iRBC 群において RBC 群より有意に低下した。

#### (3) *B. ovata* 感染雌ダニにおける TOR 経路関連タンパク質の検出

上述のとおり *B. ovata* 感染雌ダニを作出し、産卵準備期の雌ダニより脂肪体、卵巣、体液(ヘモリンフ)を採取した。脂肪体における Vg 合成ならびにヘモリンフから卵巣への Vg 取り込みに関わる分子について、*B. ovata* 感染雌ダニにおけるタンパク質の発現を Western blotting 法により解析した。その結果、非感染雌ダニと比較し、*B. ovata* 感染雌ダニでは、脂肪体とヘモリンフに Vg の蓄積が認められた。上記の結果と総合すると、*B. ovata* 感染時には脂肪体における Vg 合成に変化は起こらないが、脂肪体からヘモリンフ中に放出された Vg の卵巣への取り込みが抑制され、その結果としてヘモリンフに Vg が蓄積したと推測された。また、ヘモリンフ中に過剰な Vg が存在することにより、脂肪体からの Vg 放出にも抑制がかかったものと考えられた。

#### (4) *B. ovata* 感染雌ダニにおける TOR 経路関連分子の機能解析

RNA 干渉法により TOR 経路関連分子の遺伝子発現を抑制した雌ダニを作出し、*B. ovata* 感染ウシ赤血球を吸血させたところ、卵巣における原虫検出率が対照群に比べ有意に低下した。したがって、フタトゲチマダニにおける *B. ovata* の卵巣への侵入あるいは感染の維持において、Vg 合成・取り込みに関与する分子が重要な役割を果たすと推測された。

#### (5) フタトゲチマダニの卵母細胞発育ステージの基準設定

*B. ovata* 感染卵母細胞の形態学的解析を実施するうえで、リファレンスとなる *B. ovata* 非感染雌ダニの卵母細胞発育過程について把握する必要がある。そこで、フタトゲチマダニ雌ダニについて、未吸血から産卵期における卵巣および卵母細胞の発育を組織学的に観察し、発育ステージを ~ に分類する基準を設定した。これらの成果は Parasitol Int 誌に掲載された(発表論文 )。

#### (3) *T. orientalis* 感染フタトゲチマダニの作出法確立

上述の *B. ovata* とは異なり、*T. orientalis* の *in vitro* 培養法はまだ確立されていない。そこで、ウシ赤血球置換免疫不全マウスを用い、*T. orientalis* 感染ウシ赤血球を同マウスに接種することにより、*T. orientalis* 感染動物モデルを作製した。この感染マウスでフタトゲチマダニ幼ダニを吸血させ、変態・脱皮後の若ダニ(未吸血)より唾液腺を摘出し、*T. orientalis* 検出を試みた。その結果、*T. orientalis* 遺伝子を PCR により増幅・検出可能であることが確認され、さらに、特異抗体を用いた免疫染色により、唾液腺細胞内の *T. orientalis* が観察された。これらの成果は Int J Parasitol 誌に掲載された(発表論文 )。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6件)

Hayashida K, Umemiya-Shirafuji R, Sivakumar T, Yamagishi J, Suzuki Y, Sugimoto C, Yokoyama N. Establishment of a mouse-tick infection model for *Theileria orientalis* and analysis of its transcriptome. Int J Parasitol. 2018; 48(12): 915-924. doi: 10.1016/j.ijpara.2018.05.012. 査読有 .

Mihara R, Umemiya-Shirafuji R, Abe Y, Matsuo T, Horiuchi N, Kawano S, Fujisaki K, Suzuki H. The development of oocytes in the ovary of a parthenogenetic tick, *Haemaphysalis longicornis*. Parasitol Int. 2018; 67(4): 465-471. doi: 10.1016/j.parint.2018.04.006. 査読有 .

Umemiya-Shirafuji R, Hatta T, Okubo K, Sato M, Maeda H, Kume A, Yokoyama N, Igarashi I, Tsuji N, Fujisaki K, Inoue N, Suzuki H. Transovarial persistence of *Babesia ovata* DNA in a hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, in a semi-artificial mouse skin membrane feeding system. Acta Parasitol. 2017; 62(4): 836-841. doi: 10.1515/ap-2017-0100. 査読有 .

Sato M, Hatta T, Maeda H, Tsubokawa D, Alim MA, Tsuji N, Inoue N, Suzuki H, Umemiya-Shirafuji R. Application of Percoll density gradient centrifugation for separation of *Babesia ovata*-infected erythrocytes. J. Protozool. Res. 2017; 27(1-2): 8-12. [https://doi.org/10.32268/jprotozoolres.27.1-2\\_8](https://doi.org/10.32268/jprotozoolres.27.1-2_8). 査読有 .

Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Kusakisako K, Matsubayashi M, Umemiya-Shirafuji R, Tsuji N, Tanaka T. Initial development of *Babesia ovata* in the tick midgut. Vet Parasitol. 2017; 233: 39-42. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.11.020. 査読有 .

Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Matsubayashi M, Miyoshi T, Umemiya-Shirafuji R, Kawazu SI, Igarashi I, Mochizuki M, Tsuji N, Tanaka T. Establishment of a novel tick-*Babesia* experimental infection model. Sci Rep. 2016; 6: 37039. doi: 10.1038/srep37039. 査読有 .

#### [学会発表](計11件)

國寄真希、岡戸 清、岡田美穂、菅沼啓輔、鈴木宏志、白藤(梅宮)梨可、*Babesia ovata* 感染フタトゲチマダニにおける卵形成に関わる分子の発現解析、第27回日本ダニ学会大会、平成30年 .

Rika Umemiya-Shirafuji, Autophagy-related genes in ticks, 14th International Congress of Parasitology(ICOPA2018) (Korea), 2018. (招待講演)

Rika Umemiya-Shirafuji. Oogenesis in a parthenogenetic tick, *Haemaphysalis longicornis*. 14th International Congress of Parasitology (ICOPA2018) (Korea), 2018. (招待講演)

白藤梨可、井上昇、岡戸清、横山直明、藤崎幸蔵、鈴木宏志、玄学南 . 原虫病研究センターにおけるマダニ研究の展開 . 第70回日本衛生動物学会大会・第26回病害動物の生理分子生物談話会 . 平成30年 . (招待講演)

白藤(梅宮)梨可、國寄真希、八田岳士、岡戸清、辻 尚利、藤崎幸蔵、鈴木宏志 . *Babesia ovata* 感染フタトゲチマダニの卵形成過程における遺伝子発現変化 . 第87回日本寄生虫学会大会、平成30年 .

白藤(梅宮)梨可 . マダニ生物学から見た原虫伝播メカニズムの理解 . 第160回日本獣医学会学術集会・公衆衛生学分科会シンポジウム . 平成29年 . (招待講演)

Rika Umemiya-Shirafuji, Ryo Mihara, Yasuyuki Abe, Tomohide Matsuo, Noriyuki Horiuchi, Damdinsuren Boldbaatar, Kozo Fujisaki, Hiroshi Suzuki. Gene expression and protein localization of vitellogenin receptor in growing oocytes in parthenogenetic *Haemaphysalis longicornis* ticks, 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference & 1st Asia Pacific Rickettsia Conference (Australia), 2017.

林田京子、白藤梨可、Thillaiampalam Sivakumar、山岸潤也、鈴木 穰、杉本千尋、横山直明 . *Theileria orientalis* のマウスとマダニを用いた感染実験系の確立と遺伝子発現解析 . 第86回日本寄生虫学会大会、平成29年 .

白藤(梅宮)梨可、三原 涼、阿部靖之、松尾智英、堀内雅之、川野 優、藤崎幸蔵、鈴木宏志、フタトゲチマダニ卵母細胞の発育過程における卵黄タンパク質前駆体受容体の発現、第86回日本寄生虫学会大会、平成29年 .

白藤(梅宮)梨可、八田岳士、大久保和洋、佐藤萌子、前田大輝、横山直明、五十嵐郁男、藤崎幸蔵、井上 昇、辻 尚利、フタトゲチマダニ卵における *Babesia ovata* -チューブリン遺伝子の検出、第25回日本ダニ学会札幌大会、平成28年 .

前田大輝、八田岳士、坪川大悟、三上房子、松林 誠、白藤(梅宮)梨可、辻 尚利、田仲哲也、*Babesia ovata* 原虫におけるマダニ中腸形態へのステージシフト誘導実験、第159回日本獣医学会学術集会・日本獣医寄生虫学会、平成28年 .

#### [その他]

ホームページ等

<https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/>

(1)研究協力者

研究協力者氏名：横山直明

ローマ字氏名：YOKOYAMA, naoaki

研究協力者氏名：鈴木宏志

ローマ字氏名：SUZUKI, hiroshi

研究協力者氏名：堀内雅之

ローマ字氏名：HORIUCHI, noriyuki

研究協力者氏名：松尾智英

ローマ字氏名：MATSUO, tomohide

研究協力者氏名：林田京子

ローマ字氏名：HAYASHIDA, kyoko

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。