

平成23年6月1日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780204  
 研究課題名 (和文) ヤブカーイヌフィラリア感染系を用いた病原体伝播機構の行動学的解明

研究課題名 (英文) *Filaria* behavior involved in blood-feeding of *Aedes* mosquitoes

## 研究代表者

吉村 文 (YOSHIMURA AYA)

国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・研究員

研究者番号：90466483

## 研究成果の概要 (和文)：

イヌフィラリアにおける蚊から宿主への侵入を誘導する候補因子を *in vitro* (寒天培地) で検証した結果、感染幼虫は蚊の刺し傷に類した孔を認識して内部へと侵入することが明らかとなった。さらに、環境応答に関与する遺伝子群を同定するため、イヌフィラリアにおける RNA 干渉法 (RNAi) の確立を行なったところ、RNAi の効果が認められたため、このステージでの機能解析が可能であることを明らかにした。

## 研究成果の概要 (英文)：

The mosquito-borne disease cycle is maintained by blood-feeding and comprises an interaction between the pathogens and the blood-feeding behavior. We will understand of the interaction by analyzing entry mechanism of infective larvae from mosquito mouthparts to host skin in filariasis. In order to identify the attractants on blood-feeding, we investigated the response of *Dirofilaria immitis* infective larvae L3 to holes like a puncture wound made on agar plates. As a result, L3 showed the behavior to go into holes without blood. The observations suggest that the skin-penetrating of *D. immitis* larvae have at least two behavioral process, which are host recognition and host penetration. Furthermore, RNAi-based knockdown of development-related genes in L3 stage suggested that development mechanism of filaria is closely related with internal environments of host animals.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：寄生虫、フィラリア、ヤブカ、行動

## 1. 研究開始当初の背景

現在も世界中で多くの人や家畜が、原虫、

線虫、条虫等のさまざまな寄生虫感染症に晒されており、その被害は甚大である。蚊は、

黄熱、マラリア、フィラリアといった様々な感染症の媒介者であり、吸血行為によって宿主-蚊間の伝播サイクルを成立させている。

本研究は、依然として日本各地に蔓延しているイヌフィラリア症の感染系を用いて蚊媒介性疾患の伝播機構を解明し、蚊の吸血行動と病原体伝播機構との相互作用を理解しようとするものである。実際に自然界で成立している感染系を用いての伝播機構の解明は、安全面や飼育面から代替動物の使用を余儀なくされる研究と比べて、情報の適正さが極めて高い。現在、日本の成犬のおよそ50%がイヌフィラリアに感染していると言われる。まれにヒトの体内でもある程度生育して、肺や皮下組織に異所寄生する。しかし、有効なワクチンはなく予防薬の断続的な投与と、イヌだけでなくタヌキやキツネといった野生動物も感染対象となることから、この感染症の根絶を難しくしている。イヌフィラリアと非常に類似した感染症として、より深刻なヒトフィラリアが存在するが、病原体の感染機構と蚊の媒介性に目を向けた本研究は、薬剤治療に加えたこれら感染症伝播制御の新たな対策にもつながると考える。

## 2. 研究の目的

本研究は、依然として日本各地に蔓延しているイヌフィラリア症の感染系を用いて蚊媒介性疾患の伝播機構を解明し、蚊の吸血行動と病原体伝播機構との相互作用を理解しようとするものである。

イヌフィラリアの宿主感染様式は、蚊の口吻から外に出た後、自発的な移動により蚊の刺し傷から宿主体内に侵入すると言われていたが、その行動は殆ど未解明である。そこで申請者は、イヌフィラリアの宿主侵入がどのような行動メカニズムに基づいているのか、その全体像と分子基盤を解明し、蚊の吸血行為に対してイヌフィラリアの行動メカニズムがどのように適応してきたのかを明らかにすることを旨とする。

## 3. 研究の方法

蚊の吸血行動に伴うイヌフィラリアの宿主侵入機構の解明には、侵入を誘導する候補因子に対するイヌフィラリアの行動様式を明確にしなければならない。申請者は下記の事柄について研究をおこない、イヌフィラリアの宿主侵入を誘導する候補因子の同定、侵入に関与する行動の分離および定義化、そして侵入時に機能する感覚機能と情報伝達システムの解明をおこなう。これらの検証結果を踏まえ、最終的に蚊の口器から宿主体内に至るまでのイヌフィラリア感染機構を明らかにする。

(1) イヌフィラリア感染幼虫の行動解析および神経活動の可視化

蚊の吸血行動に伴うイヌフィラリアの宿主侵入機構の解明には、侵入を誘導する候補因子に対するイヌフィラリアの行動様式を明確にする必要がある。そこでまず、宿主侵入を誘導する候補因子の同定、および侵入に関与する動きと行動を *in vitro* で解析する。候補因子として、“宿主血液”、“宿主体温”、“蚊の刺し傷”を設定している。血液はモデル生物の線虫 *C. elegans* とフィラリア *Brugia pahangi* での走化性実験を参考におこなう。蚊の刺し傷については、細い白金線やガラスニードルを伸ばしたものを使って培地上に孔をあけ、感染幼虫の反応を解析する。そして、温度に対する反応性は、これらふたつの実験における行動パターンの変化を参考に検討する。

神経系の情報処理機能を調べるには、神経信号を可視化することが必須である。そこで、電気生理学的技術とニューロントレーシング蛍光色素 FM1-43 によるイヌフィラリア感染幼虫の神経回路網についての解析をおこなう。FM1-43 は興奮した神経細胞に選択的に取り込まれる分子であり、フィラリアと同じ線形動物に属す *C. elegans* の神経活動の解析においてその有効性が知られている。誘導候補因子に対する走化性が見られた場合、さらに成分分析をし、どのような因子に反応するのかを検証する。

(2) イヌフィラリア感染幼虫における RNA 干渉システムの検証と行動遺伝子群の単離

蚊の吸血行動に伴うイヌフィラリアの宿主侵入がどのような行動メカニズムに基づいているのか、その全体像を明らかにし、宿主侵入行動の分子基盤の解明を目指す。そのために、フィラリアと同じ線形動物、且つモデル生物である *C. elegans* の遺伝子情報を利用した分子遺伝学的解析をおこなう。実験の流れとして、これまでに明らかとされている *C. elegans* に関する遺伝子群をもとにプライマーを作成し、PCR によるイヌフィラリア cDNA からの単離を網羅的におこなう。単離できた遺伝子群について、RNA 干渉法によりその機能を阻害した後に、寒天培地上 (*in vitro*) での誘導候補因子を用いた行動表現型の解析をおこなう。*C. elegans* では、ソーキング法と呼ばれる、dsRNA が入った溶液に幼虫を浸すことによって体内に導入する方法があり、本研究でもこれを使用する。表現型に変化が認められた遺伝子は、イヌフィラリアの宿主侵入に関与する遺伝子として同定し、その性状は *C. elegans* の行動をアナロジーできる。

同定された遺伝子群と行動が、実際にイヌフィラリアの蚊の口器から宿主侵入時において必要な行動であるのかどうかを、フィラリア感染幼虫を保有するヤブカ *Aedes aegypti* 腹腔への dsRNA のインジェクション

によって検証する。

以上の実施計画に基づき、イヌフィラリアの宿主侵入行動を明らかにし、蚊の吸血特性と病原体伝播機構との相互作用の理解を目指す。

#### 4. 研究成果

イヌフィラリアにおける蚊から宿主への侵入を誘導する候補因子の同定、および侵入に関与する動きと行動の解析を試みた。候補因子として、“宿主血液”、“宿主体温”、“蚊の刺し傷”の3種類を設定し、*in vitro*での検証方法の確立と行動パターンの変化を検討した。寒天培地上に孔をあけ、フィラリア感染幼虫の反応を解析した結果、走化性実験において血液に対する正の走化性を示したものの、血液が含まれていない寒天培地上でも孔を通じて内部へと侵入することが明らかとなった。また、孔を探索する際のイヌフィラリア L3 の行動に、餌を探索する際の *C. elegans* と類似した行動 (近傍探索; local search、長距離移動; long-range roaming) が存在することを発見した。今後、パラメータとして温度を加えたときの侵入と走化性の変化を検証するとともに、宿主侵入に至る一連の行動様式を評価できるアクセスシステムの構築をおこなう予定である。

イヌフィラリアの頭部神経構造 (おもに感覚神経を中心とした) を可視下するため、*C. elegans* で一般的に用いられている DiI 色素の神経細胞への取り込みをおこなったが、フィラリア感染幼虫では取り込みが確認できなかった。そのため、神経伝達物質を抗体とした免疫染色法、あるいは感覚神経で特異的に発現している遺伝子をプローブとした *in situ* による可視下の試み、および微分干渉顕微鏡を用いた *C. elegans* との神経細胞の配置を比較することで、フィラリア感染幼虫の感覚神経の構造を同定する必要がある。

行動あるいは環境応答に関与する遺伝子群を同定するため、イヌフィラリアにおける RNA 干渉法 (RNAi) の確立を行なった。感染ステージである L3 幼虫の L4 (宿主ステージ) への発育 (脱皮) を指標として *in vitro* での検証を試みるため、イヌフィラリアから発育に関与するとされる遺伝子を単離し、ソーキング法と呼ばれる方法で解析を行なった。この方法は、特定遺伝子の二本鎖 RNA (dsRNA) が入った培養液に幼虫を浸すことによって体内に導入する方法であり、これまでに他のフィラリアでは効果が認められているが、イヌフィラリアではまだ報告がない。本研究によって、イヌフィラリアでも L3 における RNAi の効果が認められたため、このステージでの機能解析が可能であることを示した。加えて、今回の脱皮を指標とした RNAi の実験から、宿主の体内環境と L3 の発育との密接な関係

性が明らかになり、その条件として高温への移行が必須条件であることがわかった。自由生活性線虫である *C. elegans* では、高温への移行は致命的障害を与え、行動においても高温への移動は忌避を示す事が報告されている。そのため、寄生性線虫と自由生活性線虫では環境刺激に対して異なった応答メカニズムが働いていることが予想される。そこで、宿主感染における侵入および発育機構を明らかにするためには、他の寄生性線虫を用いることで共通した環境応答メカニズムを明らかにすることが必要と考えられる。

#### 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 Hiroka Aonuma, Aya Yoshimura, Tomomi Kobayashi, Kiyoshi Okado, Athanase Badolo, Bryce Nelson, Hirotaka Kanuka and Shinya Fukumoto; A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes. *Experimental Parasitology* 125: 179-183 (2010). 査読有.
- ② Namal Perera, Hiroka Aonuma, Aya Yoshimura, Tokiyasu Teramoto, Hiroshi Iseki, Bryce Nelson, Ikuo Igarashi, Takeshi Yagi, Shinya Fukumoto and Hirotaka Kanuka; Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 156: 32-36 (2009). 査読有.
- ③ Hiroka Aonuma, Aya Yoshimura, Namal Perera, Naoaki Shinzawa, Sugao Oshiro, Bryce Nelson, Shinya Fukumoto and Hirotaka Kanuka; Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasites & Vectors* 2: 15 (2009). 査読有.

[学会発表] (計 6 件)

- ① Aya Yoshimura, Kiyoshi Okado, Kazumasa Hada, Ryusuke Niwa, Shinya Fukumoto, Hirotaka Kanuka; Filarial parasites: developmental transition mechanism mediated by environmental stimuli during a bridge between vector and host. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日~12 日, パシフィコ横浜.
- ② 吉村 文, 福本晋也, 嘉糠洋陸; フィラリアの環境応答性トランジション機構の

解明. 第 55 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会, 2009 年 10 月 3 日, 帯広畜産大学.

- ③ Aya Yoshimura, Kiyoshi Okado, Kazumasa Hada, Ryusuke Niwa, Shinya Fukumoto, Hirotaka Kanuka; Transcription-linked developmental transition in filarial parasites during a bridge between vector and host. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji 2009. 9. 8-9. 11.
- ④ 吉村 文、福本晋也、嘉糠洋陸; フィラリアの生活環における環境応答性トランジション機構. 第 78 回日本寄生虫学会大会, 2009 年 3 月 27 日～28 日, 東京.
- ⑤ 吉村 文、福本晋也、嘉糠洋陸; フィラリア感染幼虫における環境依存的な脱皮関連遺伝子の探索. 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム, 2008 年 5 月 25 日～27 日, 札幌.
- ⑥ 吉村 文、福本晋也、嘉糠洋陸; フィラリアはどのようにして宿主体内への移行を理解するのか?. 第 77 回日本寄生虫学会大会, 2008 年 4 月 3 日～4 日, 長崎.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉村 文 (YOSHIMURA AYA)

国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・研究員

研究者番号：90466483