

機関番号：82111

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20880040

研究課題名（和文） マダニアミノペプチダーゼのバベシア原虫伝搬阻止機構の解明

研究課題名（英文） Molecular biological analysis of the Babesia parasite transmission blocking mechanism conducted by tick aminopeptidase.

研究代表者

八田 岳士（HATTA TAKESHI）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・研究員

研究者番号：00455304

研究成果の概要（和文）：

マダニは病原体を媒介する吸血性節足動物であり、その消化器官である中腸は血液や病原体等の異物を処理する。しかし血液消化分子が病原体伝搬に関与しているか不明である。血液消化酵素であるマダニアミノペプチダーゼ（HLLAP）の発現を人為的に抑制すると、中腸上皮を保護する囲食膜の形成が阻害され、病原体の伝搬が促進された。本研究により、マダニ中腸 HLLAP は血液消化だけでなく病原体の媒介制御にも関連していることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Tick is well known biological vector of zoonotic infectious diseases such as Lyme disease but the tick molecular function regarding pathogen transmission is poorly understood. A terminal enzyme of host blood digestion in tick midgut was an aminopeptidase, HLLAP which was shown to be involved in the regulatory effect on babesial migration in tick by inhibiting its invasion. Based on the cellular biological study, we observed that HLLAP gene silencing by RNA interference induced the immature generation of peritrophic membrane (PM) in midgut. PM is the mechanical barrier of midgut epithelium against bacterial or xenobiotic substances in host blood meal. Therefore, it was assumed that HLLAP which was responsible for the generation of PM disruption of which inhibited indirectly an invasion of *Babesia* parasite into the midgut epithelium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,290,000	387,000	1,677,000
2009年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,410,000	723,000	3,133,000

研究分野：寄生虫病学

科研費の分科・細目：(分科) 畜産学・獣医学 (細目) 応用獣医学

キーワード：マダニ、アミノペプチダーゼ、バベシア原虫、マダニ媒介感染症

## 1. 研究開始当初の背景

蚊などの大半の吸血性昆虫の血液消化様式は中腸管腔（ルーメン）内に消化酵素を分泌して血液消化を行う「細胞外消化」である（Okuda et al., 2005）。一方、マダニの血液消化様式は、中腸上皮細胞内エンドソーム・リソソーム経路による「細胞内消化」である（Coons et al., 1986）。このような消化様式の違いから、蚊の中腸ルーメン内は病原体にとって不適、マダニでは好適な環境であるように思われる。しかし、マダニが摂取した病原体のほとんどは、中腸壁通過時に消失していること（Akov, 1982）が知られており、このことからマダニ中腸上皮細胞内には血液消化と同時に病原体を傷害・排除する機構の存在が示唆され、またその存在はマダニ生存戦略上極めて重要となっている。申請者の研究チームでは既に血液消化に関連する6種類のタンパク質分解酵素群 {①H1SP (serine protease, 至適 pH4-7; Miyoshi et al., 2007), ② Longepsin (aspartic protease, pH3.5; Boldbaatar et al., 2006), ③ Longipain (cysteine protease, pH4-6; Tsuji et al., 2008), ④ Legumain (asparaginyl endopeptidase, pH7; Alim et al., 2007), ⑤ H1SCP (serine carboxypeptidase, pH6-7; Motobu et al., 2007), 及び ⑥ H1LAP (leucine aminopeptidase, pH8; Hatta et al., 2006 & 2007)} を同定・機能解明しており、これらの分子群が中腸において一連の血液消化経路を構築していることを報告した。特に、Longipain については、消化酵素としての機能に加え、媒介バベシア原虫に対する傷害活性を持つこと (Tsuji et al., 2008)、H1LAP については血液消化の最終酵素として機能しているだけでなく、RNA 干渉法 (RNA interference, RNAi) により *H1LAP* 遺伝子を抑制したマダニでは、媒介バベシア原虫の経卵巣伝搬が亢進していることが判明した。これらの分子はマダニがバベシア原虫のベクターへと進化する過程で、独自に機能を改変したと想定されるドメイン構造などを通じて特有の機能を発揮しているものと示唆された。以上の経緯より、マダニ中腸の血液消化酵素群には、バベシア原虫など病原体を排除する機能を併せ持つ可能性が強く示唆された。

## 2. 研究の目的

申請者は、上述のように H1LAP の分子機能の中に、侵入バベシア原虫に対する未知の作用を示すと考えられる重要な知見を得ており、

本研究では、特に中腸に着目し、その上皮細胞内で発現する H1LAP が、侵入バベシア原虫とどのような分子間相互作用のもとで原虫の侵入・突破の制御に関与しているのかを明らかにする。そのために① *B. gibsoni* 感染犬を吸血させたマダニの中腸におけるバベシア原虫の挙動と、中腸上皮細胞内の内在性 H1LAP の発現動態を細胞生物学的に比較する。そのため、中腸組織切片上で *B. gibsoni* と内在性 H1LAP を検出する特異抗体と二色の蛍光標識二次抗体を用いた多重免疫蛍光染色による共焦点レーザー顕微鏡観察を行う。また原虫と内在性 H1LAP 分子の相互関係については、Laser Microdissection (LMD) 法と PCR 法あるいは Western Blotting 法を組み合わせたそれぞれ LMD-PCR 及び LMD-WB を用いた分子生物学的及び細胞生物学的解析によって明らかにする。② *H1LAP* 遺伝子抑制マダニ中腸における原虫の挙動についても①と同様の手法により詳細に解析する。③ *B. gibsoni* の *in vitro* 培養系を用い、組換え H1LAP の原虫増殖抑制効果あるいは殺滅効果を検討する。

## 3. 研究の方法

本研究は、H1LAP 分子のバベシア原虫に対する傷害・増殖抑制効果を検証するために、初年度（平成 20 年度）では、*B. gibsoni* 感染犬を吸血させたマダニの中腸におけるバベシア原虫の挙動と、中腸上皮細胞内の内在性 H1LAP の発現動態を細胞生物学的に比較する。また、LMD-PCR 法及び LMD-WB 法により、バベシア原虫感染・非感染中腸上皮細胞間における H1LAP 発現変化を検証する。次年度（平成 21 年度）では、逆遺伝学的に *H1LAP* 遺伝子発現を抑制したマダニ体内でのバベシア原虫中腸上皮細胞侵入・突破について分子生物学的及び細胞生物学的手法を用いて解析する。そのために、中腸上皮細胞における H1LAP 発現とバベシア原虫の細胞侵入効率の相関について、LMD 法を用いた一細胞解析により検証する。さらに *B. gibsoni* の *in vitro* 培養を用いて、組換え H1LAP の原虫増殖に対する効果を主に生化学的に解析する。

## 4. 研究成果

マダニは、ライム病やダニ脳炎など人獣共通感染症のベクターであり、病原体伝搬に関与するマダニの分子機能は不明な点が多い。吸血によりマダニに取り込まれた病原体は、血液蛋白質と同様に中腸消化上皮細胞に取り込まれ、血体腔へと移行する。このように血液消化と病原体移行が同様の経路を辿るこ

とから、マダニの血液消化酵素群と移行病原体の間に機能的連関があることが想定される。先行研究から、バベシア原虫の卵への移行は、血液蛋白質分解経路の最終段階で作用するマダニアミノペプチダーゼ (HLLAP) 遺伝子発現の抑制によって促進されることが観察されている。そこで本研究では、HLLAP が原虫媒介過程にどのように関わっているのか、詳細な生化学的および細胞生物学的解析によって検討・考察を行うこととした。

(1) 平成 20 年度では、中腸組織切片を用いた核染色による細胞生物学的解析により、アミノペプチダーゼ遺伝子発現を抑制したマダニの中腸管腔内バベシア原虫が、陰性対照のマダニ中腸管腔内バベシア原虫数と比較し、有意に減少していることを観察した。マダニ組織切片上におけるバベシア原虫の免疫組織学的検出および LMD を用いた検出は重要な細胞生物学的ツールである。研究開始当初、バベシア原虫に特異性の高いモノクローナル抗体を作製し、バベシア原虫感染血液の塗沫標本とマダニ中腸組織切片において、間接免疫蛍光抗体染色を行った。確立したモノクローナル抗体は、血液塗沫標本における赤血球内原虫の特異的検出に成功したが、中腸組織内の原虫に対しては検出に至らなかった。また、LMD を用いた中腸組織細胞内バベシア原虫の検出を試みたが、中腸細胞への原虫感染率が低いためか、検出に至らなかった。

(2) 平成 21 年度において、前年度より引き続き、原虫感染血を吸血したマダニ中腸の詳細な形態観察を行った結果、HLLAP 遺伝子発現抑制マダニにおいて、中腸管腔の上皮細胞層上における囲食膜 (PM) の形成不全が確認された。PM は吸血した血液中の微生物等から中腸細胞を保護する役割があり、PM 形成に必須な HLLAP が、原虫のマダニ体腔内侵入を間接的に抑制していることが十分に考えられる。バベシア原虫の試験管内培養系に HLLAP 組換え蛋白質を添加したところ、バベシア原虫の発育・増殖に影響を及ぼさなかったことから、HLLAP そのものにバベシア原虫に対する直接的な作用は認められなかった。以上の成果よりマダニの血液消化酵素である HLLAP について、バベシア原虫の媒介制御に関わる間接的な制御機構のメカニズムに関する機能の一端を解明することができた。

#### 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 2 件)

①Hatta T, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Alim MA, Yamaji K, Anisuzzaman, Fujisaki K. “Leucine aminopeptidase, HLLAP, from

the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays vital roles in the development of oocytes.” *Parasitol Int.* 査読有, 2010;59(2):pp286-289.

②Hatta T, Tsuji N, Miyoshi T, Alim MA, Islam MK, Fujisaki K. “Leucine aminopeptidase in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*: endogenous expression profiles in midgut.” *J Vet Med Sci.* 査読有, 2009;71(5):pp589-594.

[学会発表] (計 7 件)

①八田岳土、バベシア原虫のマダニ介卵伝播におけるマダニアミノペプチダーゼの役割、第 8 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2009 年 10 月 10 日、千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

②八田岳土、アミノペプチダーゼ HLLAP 遺伝子発現抑制マダニにおける産卵数減少メカニズムの解析、第 148 回日本獣医学会学術集会、2009 年 9 月 25 日、とりぎん文化会館 (鳥取県)

③八田岳土、バベシア原虫感染フタトゲチマダニにおける卵巣内移行原虫の定量的検出、第 147 回日本獣医学会学術集会、2009 年 4 月 3 日、栃木総合文化センター (栃木県)

④八田岳土、マダニのバベシア原虫感染発育胚におけるアミノペプチダーゼ遺伝子の発現応答、第 78 回日本寄生虫学会大会、2009 年 3 月 27 日、法政大学市谷キャンパス (東京都)

⑤八田岳土、マダニアレイ解析：マダニにおけるバベシア原虫の介卵伝播に関わる生物活性分子の探索、第 7 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム、2008 年 10 月 11 日、松山市男女共同参画推進センター (コムズ) (愛媛県)

⑥Hatta T, The Impact of Tick Leucine Aminopeptidase Gene Silencing on the Transovarial Transmission of *Babesia gibsoni*, The 6<sup>th</sup> International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens, 20080923, Argentina

⑦八田岳土、ロイシンアミノペプチダーゼ遺伝子抑制マダニにおける *Babesia gibsoni* 介卵伝搬効率の上昇、第 77 回日本寄生虫学会大会、2008 年 4 月 4 日、長崎ブリックホール (長崎県)

[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

八田 岳士 (HATTA TAKESHI)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究  
機構・動物衛生研究所・研究員  
研究者番号：00455304

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：