

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21321

研究課題名(和文) ツツガムシと相互作用する共生細菌叢の解析を通してつつが虫病制圧の可能性を探る

研究課題名(英文) Analyses of endosymbionts in chigger mites: Toward the eradication of tsutsugamushi disease

研究代表者

陰山 大輔 (KAGEYAMA, DAISUKE)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：60401212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ツツガムシ類におけるDNA抽出法の改良およびDNAバーコーディング法の改良により、種判別に必要とされるミトコンドリアDNAを効率よく増幅することを可能にした。わが国の主要なツツガムシ(フトゲツツガムシ、フジツツガムシ、ヤマトツツガムシ)について、ミトコンドリアCox1遺伝子の全長を決定し、改良DNAバーコーディング法で塩基配列を決定した。さらに、これまでに報告されているツツガムシ類のミトコンドリアCox1遺伝子の塩基配列と合わせて分子系統解析を行ない、同種とされてきたツツガムシに亜型が存在することを明らかにした。これにより、遺伝子型の違いと共生細菌種のマッチングが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

つつが虫病は現在でも年間400～800人ほどの患者が報告される重要なダニ媒介性感染症の1つであり、毎年のように死亡例も報告されている。ダニの一種ツツガムシの刺咬によりつつが虫病リケッチアが媒介され、ヒトが感染する。我が国で主要なツツガムシの遺伝解析を行い、1つであるとされていた種に複数の亜型が存在することを明らかにした。従来困難であった1個体からのDNA抽出と遺伝子増幅が可能になったため、個体ベースで、遺伝子型の違いと共生細菌種をマッチングすることが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We improved the method of DNA extraction and DNA barcoding of chigger mites, which enabled the efficient amplification of mitochondrial DNA sequences necessary for species identification. We sequenced the full sequence of Cox1 for three major chigger mites in Japan. Moreover, together with the previously reported Cox1 sequences of chigger mites, we performed molecular phylogenetic analyses, which revealed that a certain species can be separated into several subtypes. Our study have made it possible to perform individual-based comparison of mitochondrial haplotype variations and endosymbiont variations in chigger mites.

研究分野：昆虫学・進化生物学

キーワード：ツツガムシ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

つつが虫病の発生は、古くから知られ、戦後患者が急増しほぼ全国で報告されるようになった。現在でも年間 400~800 人ほどの患者が報告される重要なダニ媒介性感染症の 1 つであり、毎年のように死亡例も報告されている。ダニの一種ツツガムシの刺咬により共生細菌の *Orientia tsutsugamushi* (つつが虫病リケッチア) が媒介され、ヒトは感染する。

### 2. 研究の目的

本研究では、媒介ダニのツツガムシに宿主を操作する細菌 *ボルバキア* が高頻度で共生していることが発見されたことを受けて、*ボルバキア* によるつつが虫病リケッチアの抑制・駆逐の可能性を追求する。

### 3. 研究の方法

ツツガムシ 1 個体からの DNA 抽出法を確立する。また国内には複数種のツツガムシが存在するため、動物分類のための DNA バーコーディング法を改良する。それらが可能になると、塩基配列の決定により種を判別し、次世代シーケンズ解析による共生細菌叢解明に進む。

### 4. 研究成果

ツツガムシ類は体サイズが非常に小さい。またダニ類は一般的に DNA 抽出が困難なことが多い。これらのことからことから、1 個体から十分な質と量の DNA を安定的に抽出することが非常に困難であった。我々は、DNA 抽出の方法を改良することにより、今まで困難であった個体別に抽出した DNA から PCR 増幅を行うことが可能となった。

また動物分類のために行われてきた DNA バーコーディング法を改良することにより、種判別に必要とされるミトコンドリア DNA を効率よく増幅することが可能となった。そこで、ツツガムシの分類基盤を構築するため、我が国でつつが虫病リケッチアを媒介する *Leptotrombidium* 属(タテツツガムシ、フトゲツツガムシ、フジツツガムシ)および *Neotrombicula* 属(ヤマトツツガムシ)の cytochrome c oxidase 1 遺伝子 (COX1) の配列を決定した。

DNA バーコーディング法の改良は、DNA バーコーディング用汎用プライマーについて、Forward 配列をツツガムシに合わせて塩基置換させた縮重プライマーにすることと、Reverse 配列の 3' 末端を延長し安定性を増したプライマーにすることによって行った。

検出用のユニバーサルプライマーを改良し、ツツガムシ 1 匹ずつから DNA の抽出を行い、PCR を行なったところ、形態学的にタテツツガムシと推定されたサンプルの陽性率が、改良前 (55.3%) に比べ、改良後 (72.8%) 大幅に増加した。フトゲツツガムシ、フジツツガムシ、ヤマトツツガムシの検出陽性率は減少することなく維持され (87.9~96.9%)、検出の質 (バンドの太さやエクストラバンドの減少) が大幅に改善された。また、*Leptotrombidium* 属および *Neotrombicula* 属以外のサダ *Gahrliopia* 属 (サダスク・ガーリエップツツガムシ) や *Walchia* 属 (ワルヒツツガムシ) の検出も可能であった (87.5~100%)。今後、遺伝子解析を進めていくうえでの基盤を構築することができた。

さらに、これまでに報告されているツツガムシ類のミトコンドリア Cox1 遺伝子の塩基配列と合わせて分子系統解析を行なった。その結果、形態学的に同種とされるツツガムシでも遺伝子レベルではいくつかの亜型が存在することが明らかとなった (Ogawa et al., *Journal of Parasitology*, in press)。これにより、遺伝子型の違いと共生細菌種のマッチングを行うことが可能となり、現在、16S rDNA を標的とした細菌叢解析 (次世代シーケンサー Illumina Miseq を用いたアンプリコン解析) を行い、ツツガムシの種類別、地域別に、どのような共生細菌が感染しているのかを詳細に解析しているところである。また、ツツガムシの共生細菌の検出のために細菌の 16S rDNA を標的とした PCR (細菌ユニバーサル PCR) を行なったところ、陽性率は、87.7~100% であった。今後、16S rDNA を標的とした細菌叢解析 (次世代シーケンサー Illumina Miseq を用いたアンプリコン解析) を行い、ツツガムシの種類別、地域別などの共生細菌の特徴を解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ogawa M, Takada N, Noda S, Takahashi M, Matsutani M, Kageyama D, Ebihara H	4. 巻 109
2. 論文標題 Genetic variation of Leptotrombidium (Acari: Trombiculidae) mites carrying Orientia tsutsugamushi, the bacterial pathogen causing scrub typhus.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Parasitology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 陰山大輔
2. 発表標題 昆虫の生殖を操る共生細菌ボルバキア：その多様な能力と生態について
3. 学会等名 第72回日本衛生動物学会東日本支部大会 シンポジウム1：ボルバキアの基礎と応用（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陰山大輔
2. 発表標題 昆虫の生殖を操る共生細菌ボルバキア：その多様な能力と生態について。
3. 学会等名 第72回日本衛生動物学会東日本支部大会 シンポジウム1：ボルバキアの基礎と応用（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 陰山大輔
2. 発表標題 オス殺し細菌と宿主昆虫とのせめぎ合いは性決定システムの多様化をもたらすか？
3. 学会等名 第76回日本生物地理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	小川 基彦  (Ogawa Motohiko)  (10322710)	国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官    (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------