

機関番号：10101  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2009 ～ 2010  
 課題番号：21880003  
 研究課題名（和文） ツェツェバエに由来するトリパノソーマの昆虫型分化誘導物質の同定  
 研究課題名（英文） Identification of the regulatory factor for insect-form transformation of trypanosomes from tsetse flies  
 研究代表者：  
 宮崎 智史 (MIYAZAKI SATOSHI)  
 北海道大学・大学院獣医学研究科・博士研究員  
 研究者番号：20547781

## 研究成果の概要（和文）：

トリパノソーマ (*Trypanosoma* spp.) が哺乳類の血液に感染することで引き起こされるアフリカ睡眠病の制御には、感染時に起こる昆虫型への細胞分化の機構を理解しなければならない。本研究ではその細胞分化を誘導する遺伝子候補として *Glossina serine protease 1* (*Gsp1*) を単離し、それがセリンプロテアーゼドメインを有することを示した。先行研究を考慮すると、多重化した消化酵素遺伝子の一部が昆虫型分化誘導を担う新奇のドメインを独立に獲得し、*Gp1* 遺伝子が進化したと示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

To control the African Sleeping Sickness, which is caused by the infection of trypanosome parasites (*Trypanosoma* spp.) into mammalian blood, it is required to understand the regulatory mechanisms for cell differentiation into insect form parasite at the timing of infection. In this study, the full length of *Glossina serine protease 1* (*Gsp1*) was isolated by RACE PCR as the candidate of regulatory molecules, and it was showed that *Gsp1* have the trypsin-like serine protease domain. Considering the previous studies, one of the serine protease genes duplicated might gain the novel function for controlling the insect-form transformation of *Trypanosoma*. I

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,110,000 円	333,000 円	1,443,000 円
平成 22 年度	1,010,000 円	303,000 円	1,313,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000 円	636,000 円	2,756,000 円

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： アフリカ睡眠病 トリパノソーマ ツェツェバエ  
 分化制御因子 サシバエ 遺伝子重複  
 RACE 法 セリンプロテアーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の血液に寄生してアフリカ睡眠病を引き起こすトリパノソーマ (*Trypanosoma* spp.) は、ツェツェバエによってのみ伝播され、その際に血流型から昆虫型へと細胞分化を起こす。従って、その昆虫型分化を誘導する物質がツェツェバエの体内に存在すると予想され、その作用機序を理解することが本感染症の制圧に貢献すると期待された。現在までに、ツェツェバエの1種 *G. fuscipes* に由来する *Glossina proteolytic lectin* (*Gpl*, 消化酵素遺伝子) の組換えタンパク質について、昆虫型分化誘導能が確認されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、*Gpl* などの消化酵素遺伝子が昆虫型分化の制御に関わっているとの仮説を検証するため、媒介性のツェツェバエ *G. morsitans* 及び非媒介性のサシバエ *Stomoxys calcitrans* より *Gpl* 相同遺伝子を単離し、それらの配列を用いた *in silico* 解析により両遺伝子の機能を推定・比較した。

### 3. 研究の方法

対象2種より RACE PCR 法等を用いて *Gpl* 相同遺伝子の全長配列を単離し、両配列について *in silico* 解析を行った。

### 4. 研究成果

まずは *Gpl* 配列をもとに設計した degenerate primer を用いて *Gpl* 相同遺伝子の部分配列の単離を試みた。その結果、ツェツェバエからはツェツェバエ及びサシバエから、それぞれ3つ及び5つの *Gpl* 類似配列が得られ、両種における遺伝子重複の可能性が示唆された (図1)。

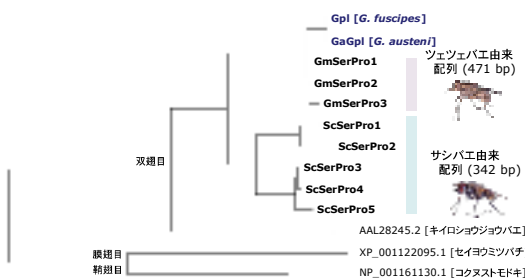


図1. 既知の *Gpl* 相同遺伝子とツェツェバエ及びサシバエから得られた *Gpl* 類似配列の分子系統樹 (NJ 法)。

続いてそれらの中から最も *Gpl* に類似した配列をそれぞれ選び、RACE 法によって各遺伝子の全長配列を得た。ツェツェバエからは既知の *Gpl* 相同遺伝子である *Glossina serine*

*protease 1* (*Gsp1*) が、サシバエからは新規の *Stomoxys serine protease x* (*Sspix*) が得られた。*Gpl* と予想アミノ酸配列を比較すると、*Gsp1* (92%) の方が *Sspix* (78%) よりも高い類似度を示した (表)。しかしながら、ともに同一のセリンプロテアーゼドメインを有することから (図2, 図3), 同様の酵素活性が予想された。

表. *Gsp1*, *Sspix* 及び *Gpl* の予想アミノ酸配列における一致度と類似度。

一致度/類似度	<i>Gpl</i>	<i>Gsp1</i>	<i>Sspix</i>
<i>Gpl</i> (274 aa)	-	88.8	65.5
<i>Gsp1</i> (276 aa)	92.1	-	66.1
<i>Sspix</i> (272 aa)	77.8	79.4	-

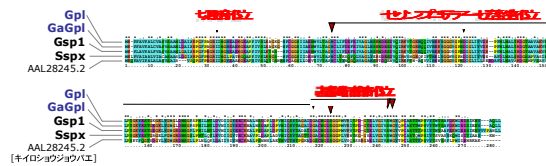


図2. 各 *Gpl* 相同遺伝子の予想アミノ酸配列のアラインメントとプロテアーゼ活性部位。全ての配列は同一のトリプシン様セリンプロテアーゼドメイン (Tryp\_SpC) を有し、活性部位等も全て保存されていた。全てについてタンパク質分解機能が予測された。



図3. トリプシン様セリンプロテアーゼドメイン (Tryp\_SpC; cd00190) の予想立体構造 (NCBI, CD-search)。これらのドメインを有する因子の多くは zymogen と呼ばれる不活性型の前駆体として合成されるが、特定の因子により切断部位で切断されると活性型となる。

一般に吸血昆虫では消化酵素遺伝子が多重化しやすく、その一部が独立に新奇の機能を獲得することが起こりうる。従ってツェツェバエにおいても、多重化した消化酵素遺伝子

の一部（図1）が昆虫型分化誘導を担う新奇のドメインを独立に獲得し、*Gpl* 遺伝子が進化したと示唆された。今後はその新奇ドメインを明らかにし、両遺伝子の作用機序の違いを理解することが期待される。

#### 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5件）

- Y. Okada, S. Miyazaki, H. Miyakawa, A. Ishikawa, K. Tsuji and T. Miura. 2010. Ovarian development and insulin-signaling pathways during reproductive differentiation in the queenless ponerine ant *Diacamma* sp. *Journal of Insect Physiology* 56: 288–295. 査読有
- S. Bawn, S. Tiwananthagorn, K. S. Lin, J. Hirota, T. Irie, L. L. Htun, N. N. Maw, T. T. Myaing, N. Phay, S. Miyazaki, T. Sakurai, Y. Oku, H. Matsuura and K. Katakura. 2010. Evaluation of Myanmar medicinal plant extracts for antitrypanosomal and cytotoxic activities. *The Journal of Veterinary Medical Science* 72: 525–528. 査読有
- S. Miyazaki, T. Murakami, T. Kubo, N. Azuma, S. Higashi and T. Miura. 2010. Ergatoid queen development in the ant *Myrmecina nipponica*: modular and heterochronic regulation of caste differentiation. *Proceedings of the Royal Society B* 277 (1690): 1953–1961. 査読有
- H. Miyakawa, M. Imai, N. Sugimoto, Y. Ishikawa, A. Ishikawa, H. Ishigaki, Y. Okada, Miyazaki, S., S. Koshikawa, R. Cornette and T. Miura. 2010. Gene up-regulation in response to predator kairomones in the water flea, *Daphnia pulex*. *BMC Developmental Biology* 10: 45 (doi:10.1186/1471-213X-10-45). 査読有
- Y. Okada, S. Miyazaki, S. Koshikawa, R. Cornette, K. Maekawa, K. Tsuji and T. Miura. 2010. Identification of a reproductive-specific, putative lipid transport protein gene in a queenless ponerine ant *Diacamma* sp. *Naturwissenschaften*. 97: 971–979. 査読有

〔学会発表〕（計6件）

宮崎智史, 櫻井達也, 片倉賢. 2011. 宿主—媒介昆虫間の移動に伴うトリパノソーマ原虫 *Trypanosoma brucei* の表現型分化における分子制御機構. 日本生態学会第58回大会. 札幌コンベンションセンター 札幌. 2011年3月11日.

Miyazaki, S., Sakurai, T., Oku, Y. and Katakura, K. 2010. Isolation and characterization of serine proteases of tsetse and stable flies, and their roles in the differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* into procyclic forms. The 2nd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control, Hokkaido University, Sapporo. 13 September 2010.

T. Miura and Miyazaki, S. 2010. Ergatoid queen differentiation in the ant *Myrmecina nipponica*: Modular and heterochronic regulation of caste differentiation. The 49<sup>th</sup> annual Canadian Society of Zoologists Meeting, University of British Columbia, Vancouver, Canada. 18 May 2010.

宮崎智史. 2009. トゲオオハリアリの体色にみられる性的二型の発現機構. 京都大学生態学研究センター共同利用事業 研究集会「表現型可塑性の生物学」, 口頭発表, 北海道大学 札幌. 2009年11月14日.

宮崎智史, 三浦徹. 2009. トゲオオハリアリ *Diacamma* sp. (Hymenoptera: Formicidae) にみられる顕著な性的二型発現の分子制御機構. 第11回日本進化学会大会, P01-02, ポスター発表. 北海道大学 札幌. 2009年9月3日.

S. Miyazaki, K. Katakura, Y. Oku, H. Gotoh, H. Miyakawa and T. Miura. 2009. Developmental mechanisms of distinct sexual dimorphism in the ponerine ant *Diacamma* sp. (Hymenoptera: Formicidae). The 1st International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2009, P-9, Poster Presentation, Venue Hotel Niseko Ikoinomura. 20 August 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 智史 (MIYAZAKI SATOSHI)

北海道大学・大学院獣医学研究科・博士研究員

研究者番号：20547781

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし