

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19381

研究課題名（和文）ホロゲノムトランスクリプトーム解析を用いてマダニと細菌の共生関係の分子基盤に迫る

研究課題名（英文）Hologenome transcriptomic analysis to understand the molecular basis of tick-bacteria symbiosis

研究代表者

林 哲也（Hayashi, Tetsuya）

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10173014

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）：様々な病原体を媒介するマダニには多様な微生物が共生しているが、その分子基盤はほとんど不明である。フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* (LON) は、紅斑熱リケッチアなどのベクターであるが、両性生殖系統のLONには *Candidatus Rickettsia longicornii* (Rlon) が存在し、経卵感染を介して安定に維持されている。本研究では、微生物-マダニ共生の分子基盤の解明に向けて、LONの長期継代飼育系を利用して、同じ遺伝的背景をもつRlon陽性/陰性系統の作成に挑み、両性LONに関しては増殖サイクルを1サイクル回してRlon陽性の成ダニ（全て雌）が得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以下の知見が学術的に重要である。1) 両性及び単為生殖系で腹腔接種によりRlonの感染は成立する、2) 各ステージにおけるRlonのコピー数は野生の両性LONに比べて著しく少ないことから、何らかの適応メカニズムが存在する可能性がある、3) 途中の段階で多数の個体が死亡したことから、Rlonの感染がマダニ（特に単為生殖系）にストレスとなっている可能性がある、4) 両性系から得られた成ダニは全て雌であったという予想外の結果は、フォルバキアで知られているようなRlonの感染がマダニの生殖に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆されるが、このような現象はフォルバキアで知られているがリケッチアでは報告が無い。

研究成果の概要（英文）：Ticks, which transmit various pathogens, also carry various microbial symbionts, but their molecular bases are largely unknown. Although *Haemaphysalis longicornis* (LON) is known as a vector of *Rickettsia japonica* and other pathogens, its bisexual lineages stably carry *Candidatus Rickettsia longicornii* (Rlon) via transovarial transmission. Toward the understanding of molecular bases of microbe-tick symbiosis, we tried to establish isogenic Rlon-positive / negative LON lineages by using bisexual and parthenogenetic lineage of LON which have been maintained by long-term breeding. Although only for the bisexual lineage, we obtained Rlon-positive adults through breeding LON individuals experimentally inoculated with Rlon for one life cycle.

研究分野：細菌学

キーワード：ホロゲノム トランスクリプトーム ダニ 細菌 共生

1. 研究開始当初の背景

マダニは様々な病原体のベクターとなっており、病原体以外にも様々な共生微生物がマダニに存在する。病原体のヒトに対する病原性の研究はある程度進んでいたが、共生微生物との関係(相互作用の実態)は、ほとんど不明であった。種々の微生物の中でもリケッチア科細菌などは経卵感染が可能であり、マダニと特に緊密な共生関係にあると考えられる。研究代表者は種々の微生物のゲノム解析の一環としてリケッチア科の解析にも取り組み、国内に広く分布するフタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* (LON) の両性生殖系統が高頻度に *Ca. Rickettsia longicornii* (Rlon) を保有することを見出した。一方、研究分担者によって10年以上にわたり、ウサギを用いたLONの長期継代飼育が実施されており、この系を利用して、遺伝的に同一なRlon保有・非保有系統のLONを作出し、Rlon共生の影響やLONとRlonの相互作用をマダニの全生活環を通して解析できると考えられた。また、LONのゲノム情報が公開されたため、様々な技術的課題を解決する必要はあるものの、Hologenome transcriptome (HG-transcript) 解析により、遺伝子発現の面からLON/Rlon共生の分子基盤に迫ることができる可能性が生まれてきた。

2. 研究の目的

LONの長期継代飼育系を利用してRlon保有・非保有系を確立し、Rlon共生時のLONの特性変化、発育ステージに沿ったHG-transcript等を行い、LONとRlonの共生関係の実態と関連遺伝子群の同定を試みることで、これをモデル解析系としてマダニ/病原体の共生関係の分子基盤解明という研究分野開拓に挑戦する。

3. 研究の方法

マダニの生活環は、幼ダニ・若ダニ・成ダニの3ステージからなり、各ステージから次に進むためには、哺乳動物の血液を吸血する必要がある(3回の吸血)。吸血の前後で脱皮によって形態が変化し、成ダニでは吸血により交尾と産卵が可能になる。このサイクルが回るのに6ヶ月を要するため、3年間の計画とした(以下、当初の研究計画)。

【項目1】Rlon保有系統の確立：培養したRlonを両性・単為生殖系に感染させ、Rlon保有系統を作出する。感染には人工吸血、血体腔接種、肛門接種の3つの方法を試みる。生活環を回し、安定的にRlonを保有する系統を作出する。感染の有無は定量PCRで確認する。この解析で単為生殖系にもRlonが共生できるか否かが判明する。

【項目2】HG-transcript解析系の確立：マダニ用のrRNA除去は市販キットで対応不可のため独自に作成して予備的HG-transcript解析を実施し、必要なデータ量等を検討する。

【項目3】Rlon共生によるマダニの生物学的特性の変化：Rlon保有・非保有系統の吸血行動、産卵と孵化効率、経卵感染効率を比較解析する。

【項目4】HG-transcript解析：ダニ個体のHG-transcript解析により各ステージのLONおよびRlonの遺伝子発現を解析し(比較対照としてマウス由来L939細胞でのRlonの解析)、各ステージでの共生に関連するマダニとリケッチアの遺伝子を同定する。

4. 研究成果

【項目1】山口大学・高野愛博士の協力を得て、両性・単為生殖系LONへのRlon感染実験を行い、接種検体の調整法の違いによるRlonの感染効率と安定性を検討した。3通りの方法で調整したRlon検体を血体腔接種により接種し、LON個体内のRlonコピー数をqPCRにより解析した結果、少なくとも4週間後までは、Rlonが両系統に保持されることを確認できた。COVID-19の影響等で接種実験の開始が遅れたが、Rlon(Lon-13株)を両性及び単為生殖系LON(各65個体)に接種し、生き残った個体(41及び51個体)から15個体ずつをウサギに吸血させ、産卵させた(産卵後または産卵前に死亡した個体のnested PCRにおけるRlon陽性率は15/15と13/15)。各系統で13及び12個体が産卵したが、幼ダニが孵化したのは9及び8個体からの卵のみであった。成虫ごとに10から15の幼ダニをプールしてRlon保有をnested PCRで3回解析した結果、全て1回は陽性であった。そこで、3回のうち2回は陽性であった成虫(6及び7個体)由来の幼ダニをウサギに吸血させ、得られた若ダニ(114及び41個体)から10個体を無作為に選択し、Rlon保有をnested PCRで解析した結果、幾つかの個体ではPCR産物が検出されたが、3回の解析での再現性は低く、Rlonを保有している可能性はあるが個体内のコピー数は非常に低いと考えられた。そこで、残りの若ダニを吸血させ、成ダニの取得を目指したが、この段階で大部分の若ダニが死亡し、両性系の雌3個体と雄1個体のみが生き残った。これらを吸血させた結果、いずれも成ダニとなり、雌個体が産卵したため、孵化させた後、幼ダニを経て若ダニを得た。PCRでRlon保有個体が含まれることが確認できたため、140個体を吸血させた結果、110個体の成ダニが得られたが、全て雌であった(10個体についてPCRでRlon保有を確認)。従って、Rlonを接種した

両性 LON から増殖環を 1 回することができた。しかし、Rlon 陽性ダニの HG-transcript 解析等を行うには、もう 1 サイクル回して、確実に Rlon 陽性となった系統を得る必要があり、その解析に使用できる Rlon 陽性系統の確立には至らなかった。

【項目 2】ホロゲノムトランスクリプトーム解析系の確立：鍵となるのは rRNA の除去であるため、まず最近利用可能となった QIAseq 社のキット（QIAseq FastSelect Epidemiology Kits）を用いて、マウスと細菌（サンプル調整の問題から別菌種を使用）の混合検体からの rRNA 除去効率を検討し、マウス培養細胞への感染実験（コントロール実験）に対しては対応可能であることを確認した。しかし、独自に作成する必要のあるマダニの rRNA 除去法は、当初予定していた NEB 社のシステムが使えなくなったため、別のシステムの利用を検討することとしたが、本解析に使用できる段階の Rlon 陽性ダニ系統の確立には至らなかったため、予備的ホロトランスクリプトーム解析による rRNA 除去効率の確認と解析に必要なデータ量を検討するまでには至らなかった。

【項目 3】本項目の解析に使用できる段階の Rlon 陽性ダニ系統の確立には至らなかったため、本格的な解析（Rlon 保有系統と非保有系統の吸血行動、産卵と孵化効率を比較、経卵感染効率の解析など）を実施することはできなかった。しかし、今回の解析から、1）両性及び単為生殖系で腹腔接種により Rlon の感染は成立する、2）各ステージにおける Rlon のコピー数は野生の両性 LON に比べて著しく少ないことから、何らかの適応メカニズムが存在する可能性がある、3）途中の段階で多数の個体が死亡したことから、Rlon の感染がマダニ（特に単為生殖系）にストレスとなっている可能性がある、4）両性系から得られた成ダニは全て雌であったという予想外の結果は、フォルバキアで知られているような Rlon の感染がマダニの生殖に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されるが、このような現象はフォルバキアで知られているがリケッチアでは報告が無い。

【項目 4】本項目の解析に使用できる段階の Rlon 陽性ダニ系統の確立には至らなかったため、実施できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 大規模ゲノム解析から紐解く細菌の多様性
3. 学会等名 2021年度日本生化学会九州支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 細菌感染症とゲノム解析について
3. 学会等名 令和3年度地方衛生研究所地域専門家会議（地域保健総合推進事業）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 次世代シーケンサ（NGS）の活用によって進展する細菌ゲノムの進化・多様性解析
3. 学会等名 第41回阿蘇シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林哲也
2. 発表標題 ゲノム解析を基盤とした細菌の遺伝的多様性に関する研究
3. 学会等名 第95回日本細菌学会（浅川賞受賞講演）（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特にない。

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	田中 哲也 (Tanaka Tetsuya) (00322842)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授 (17701)	

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
---------	---------