

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22580335
 研究課題名(和文) 牛乳中の高機能タンパク質の組換えウイルスを用いた新規のマダニ防圧法開発
 研究課題名(英文) Developments for tick prevention using by baculovirus expressed with high-potential milk protein
 研究代表者
 田中 哲也(TANAKA TETSUYA)
 鹿児島大学・共同獣医学部・准教授
 研究者番号：00322842

研究成果の概要(和文)：ミルクタンパク質(high-potential milk protein: HMP)がマダニの発育・増殖に及ぼす可能性があると考えに至り、マダニ吸血後のマダニ体内に含まれるHMPのラクトフェリンの検出を行ったが、宿主血液由来のラクトフェリンの存在が確認できなかった。そこで、ラクトフェリンと同じ性質を持つ宿主血液由来のトランスフェリンの検出を試みたところ、トランスフェリンは中腸から卵巣に到達することが確認された。これらの結果より、トランスフェリンは卵巣内の卵母細胞に鉄を供給する役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that high potential milk protein (HMP) might effect against the hatching and ovipositing of ticks. However, host blood-derived lactoferrin including in the HMP was not detected into tick after blood feeding. When we tried to detect host blood-derived transferrin which has the function as well as lactoferrin, transferrin showed its unique transfer in tick by passing through the midgut until it reached the ovary. This suggest that host-derived transferrin plays a role in transporting iron to the ovary for embryogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：【ラクトフェリン、トランスフェリン、フェリチン、マダニ、ラクトペルオキシダーゼ、バキュロウイルス】

1. 研究開始当初の背景

① [マダニはヒト・動物の健康と畜産業にと

って重要な害虫]

地球上に棲息する15,000種を越える吸血

性節足動物の中で、マダニはわずか17属900種(6%)の弱小グループである。しかし、マダニは魚類以外のすべての脊椎動物に寄生可能な極めて広い宿主域と、長期・大量吸血が可能な特有の吸血・消化機構を有し、原虫、ウイルス、細菌などほぼ全種類の病原体の伝播に関与しうることから、最も重要な疾病媒介節足動物とみなされている(Barker et al. 2004)。

② [マダニとマダニ媒介疾病対策は世界的急務]

したがって、マダニとマダニ媒介性疾病に対する対策技術の開発は、ヒト・動物の衛生向上と畜産振興を図る上で不可欠であり、近年の地球温暖化、国際交易の増大によるマダニ媒介性感染症の流行域の拡大、殺ダニ剤抵抗性マダニの頻出問題と相まって、今や世界的急務となっている。

③ [我々のマダニ研究]

現在、世界中の研究者がマダニとその媒介疾病の防圧を目的として、有用なマダニ分子探索のための研究を精力的に進めている。我々も、血液消化プロテアーゼなど、20以上の新規のマダニ生物活性物質(tick-bioactive molecule: TBM)を発見し、マダニのTBM分子特性解明の分野で世界をリードしている。しかし、これらの精力的な研究をもってしても、実用的なマダニとマダニ媒介疾病の防除技術の開発は、今なお困難な状況にある。

2. 研究の目的

このような研究を背景に我々は、HMPであるラクトフェリンやラクトペルオキシダーゼの有する鉄キレート作用やヘム結合能がマダニの生存の基本であるヘムとヘムから生じる鉄の代謝に、直接的に重大な影響を及ぼすとともに、HMPがマダニの中腸で分解されることにより、その産生物によって間接的に、しかも大きな影響をマダニの発育・増殖に及ぼす可能性があると考えに至った。

3. 研究の方法

① [マダニ体内における HMP および宿主血液由来 HMP とトランスフェリンの検出]

我々はアジア・オセアニア地域で最も重要な疾病媒介であるフタトゲチマダニの臓器別のESTデータベースの作成に着手し、これまでに唾液腺、中腸、ヘモリンフ、脂肪体、卵巣、発育胚について、合計20,000クラスターを超える完全長cDNAライブラリーからなる世界最大・最高水準のマダニの遺伝子ライブラリーの構築に成功した。これらのESTデータベースを用いて、他の生物種のHMPであるラクトフェリンとラクトペルオキシダーゼと相同性の高い遺伝子配列の探索を

行ったが、HMPを見出すことが出来なかった。次に、マダニが宿主血液由来のHMPを利用している可能性を想定し、吸血後のマダニ体内のラクトフェリンの検出を行ったが、ラクトフェリンの存在は確認できなかった。そこで、ラクトフェリンと同じ性質を持つ宿主血液由来のトランスフェリンの検出を試みた。

② [マダニの鉄結合性タンパク質の機能解明]

マダニは病原微生物を媒介する吸血性の外部寄生虫であり、マダニ体内は吸血する際に血液に含まれる大量の鉄分子に暴露されることが予想される。鉄分子はマダニの生命恒常維持において不可欠であるが、時には鉄分子の過剰摂取はマダニにとって有毒になることも考えられる。しかし、マダニ体内における鉄代謝のメカニズムについては完全に明らかになっていない。そこで、我々はESTデータベースを用いて、鉄代謝を制御することが予想される分泌型フェリチン2を新規に同定し、すでに同定されている細胞内型フェリチン1とそれらの特性について比較し、フェリチンの鉄代謝における役割について検討を行った。

4. 研究成果

① [マダニ体内における宿主血液由来トランスフェリンの動態]

マダニ体内の宿主由来トランスフェリンの動態を調べるために、ウサギに雌成ダニを吸血させ、飽血後、ウエスタンブロット法によってマダニ体内のトランスフェリンの検出を試みた。また、唾液腺、中腸、卵巣、脂肪体、ヘモリンフ、卵および孵化した幼ダニについてもトランスフェリンの分布を調べた。さらに、中腸および卵巣については、間接蛍光抗体法によってトランスフェリンの検出を試みた。その結果、飽血したマダニ体内では、1ヶ月近く完全な状態でトランスフェリンが検出されたが、卵や幼ダニではトランスフェリンは検出されなかった。また、ヘモリンフ中にトランスフェリンが検出され、臓器別では中腸、卵巣でトランスフェリンが検出された(図1)。これらの結果より、トランスフェリンは中腸バリアーを突破し、ヘモリンフに移動した後、卵巣に到達し、卵巣内の卵母細胞に鉄を供給する役割を果たしている可能性が示唆された。

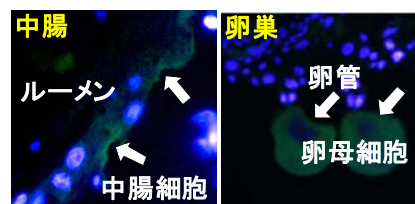


図1 成ダニ飽血後1日目の中腸と卵巣におけるトランスフェリンの局在

② [マダニの吸血および産卵におけるフェリチンの重要性]

RT-PCR とウエスタンブロット解析の結果から、マダニの各臓器とステージ別において、フェリチン遺伝子とフェリチンタンパク質の発現レベルがそれぞれ異なっていた。興味深いことに、フェリチン2遺伝子の発現レベルが微弱にもかかわらず、産卵中の卵巣や卵にフェリチン2タンパク質の存在がウエスタンブロット法と間接蛍光抗体法で確認された。また、RNA 干渉法によってフェリチン遺伝子をノックダウンしたマダニでは、吸血時の体重や産卵数が顕著に低下し、ノックダウンを行った群では飽血に至らず死亡した個体も観察された(図2)。さらに、フェリチン遺伝子をノックダウンしたマダニの中腸を組織レベルで観察したところ、中腸上皮細胞の微絨毛や細胞内顆粒の異常が認められた。

以上の結果から、マダニの吸血や産卵において、フェリチンは鉄分子の供給や鉄分子の毒性に対して、重要な制約的役割を果たす必須な分子であることが考えられた。

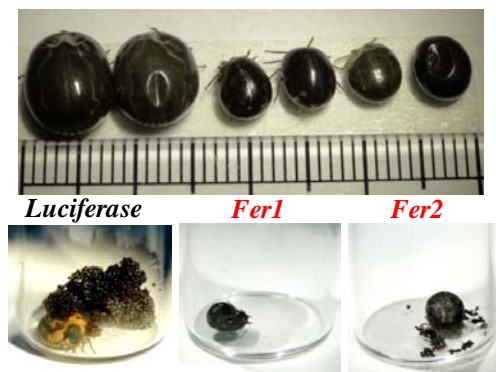


図2 RNA干渉法によってフェリチン遺伝子(Fer)をノックダウンして吸血させたフタダニ(コントロールLuciferase群に比べて吸血や産卵に阻害が認められた)

③ [得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望]

宿主血液由来トランスフェリンとマダニフェリチンの特性を解析することにより、マダニの生存と生物学における鉄代謝の機構を解明した。すなわち、マダニ体内の鉄代謝機構を明らかにすることによって、マダニ制圧に有効な治療薬やワクチン開発の基盤情報を得る可能性が高く、研究成果の学術的意義は大きい。

吸血によって積極的に異物(宿主血液、病原体)を取り込み、また長命であるため病原体侵入を受ける機会が多いマダニでは、他の節足動物と異なる独自に進化した自然免疫

系が存在している。このため、宿主血液由来トランスフェリンとフェリチンもマダニ体内の鉄の代謝機構を調節するのみならず、バベシア原虫などの病原体侵入に対する感染防御機構の一端を担う可能性も考えられる。

このように、トランスフェリンとフェリチンの自然免疫に関わる新たな生物活性を将来的に明らかにすることが出来れば、生物の自然免疫に新たな分子論的展開が開拓されることが期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計19件)

1. Maeda, H., Boldbaatar, D., Kusakisako, K., Galay, RL., Aung, KM., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Inhibitory effect of cyclophilin A from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* on the growth of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Parasite Res. 査読有 (In press) (2013)
DOI: 10.1007/s00436-013-3390-7
2. Galay, RL., Aung, KM., Umemiya-Shirafuji, R., Maeda, H., Matsuo, T., Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Suzuki, H., Xuan, X., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. J. Exp. Biol. 査読有 216: 1905-1915 (2013)
DOI: 10.1242/jeb.081240
3. Tanaka, T., Maeda, H., Matsuo, T., Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Kume, A., Suzuki, H., Xuan, X., Tsuji, N., Fujisaki, K. Parasitocidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against *Toxoplasma gondii*. Peptides 査読有 34: 242-250 (2012)
DOI: 10.1016/j.peptides.2011.07.027.
4. Tanaka, T., Maeda, H., Galay, RL., Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Suzuki, H., Xuan, X., Tsuji, N., Fujisaki, K. Tick longicin implicated in the arthropod transmission of *Toxoplasma gondii*. J. Veterinar. Sci. Technolo. 査読有 3: 112 (2012)
DOI: 10.4172/2157-7579.1000112
5. Galay, RL., Maeda, H., Aung, KM., Umemiya-Shirafuji, R., Xuan, X., Igarashi, I., Tsuji, N., Tanaka, T., Fujisaki, K. Anti-babesial activity of a potent peptide fragment derived from longicin of *Haemaphysalis longicornis*. Trop. Anim. Health Pro. 査読有 44:

[学会発表] (計 37 件)

1. Remil Linggatong Galay, Kyaw Min Aung, Hiroki Maeda, Rika Umemiya-Shirafuji, Eugene Bacolod, Jiro Koyama, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, The function of ferritin in iron transport, storage and protection against iron toxicity in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, 第82回日本寄生虫学会大会, 2013年3月, (東京)
2. 田仲哲也, Galay Remil Linggatong, 前田大輝, Kyaw Min Aung, 白藤(梅宮)梨可, 玄学南, 五十嵐郁男, 望月雅美, 辻尚利, 藤崎幸蔵, フタトゲチマダニロンギンにおける抗バベシア活性を持つペプチド部位の検索, 第154回日本獣医学会学術集会, 2013年3月(東京)
3. Remil Linggatong Galay, Kyaw Min Aung, 白藤(梅宮)梨可, 前田大輝, 松尾智英, 川口博明, 三好宣彰, 鈴木宏志, 玄学南, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニの吸血および産卵におけるフェリチンの重要性, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月, (福岡)
4. 森寛之, Remil Linggatong Galay, 前田大輝, 松尾智英, 白藤(梅宮)梨可, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニにおけるウサギ血液由来トランスフェリンの動態, 第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会, 2012年11月, (長崎)
5. 草木迫浩大, 前田大輝, Remil Linggatong Galay, 松尾智英, 白藤(梅宮)梨可, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニ体内での *Babesia microti* の動態について, 第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会, 2012年11月, (長崎)
6. Remil Linggatong Galay, Kyaw Min Aung, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroki Maeda, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, Characterization of two ferritin from *Haemaphysalis longicornis*, in particular their role in blood feeding and reproduction, Chula International Workshop PEP2012, 2012年10月, (タイ)
7. 前田大輝, Damdinsuren Boldbaatar, 草木迫浩大, Kyaw Min Aung, Galay Remil, 白藤(梅宮)梨可, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニ由来サイクロフィリン A とバベシア原虫の関連性, 第154回日本獣医学会学術集会, 2012年9月(岩手).
8. Galay Remil, Kyaw Min Aung, 白藤(梅宮)梨可, 前田大輝, 松尾智英, 川口博明, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, The importance of iron storage protein ferritin on successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, 第154回日本獣医学会学術集会, 2012年9月, (岩手)
9. Tetsuya Tanaka, Remil Linggatong Galay, Hiroyuki Mori, Kyaw Min Aung, Hiroki Maeda, Rika Umemiya-Shirafuji, Xuen Xuen, Hiroshi Suzuki, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Characterization and movement of iron binding proteins on *Haemaphysalis longicornis*, XXIV International Congress of Entomology, 2012年8月, (韓国)
10. Remil Linggatong Galay, Kyaw Min Aung, Rika Umemiya-Shirafuji, Tetsuya Tanaka, Kozo Fujisaki, Characterization of two ferritin genes from *Haemaphysalis longicornis*, in particular, their role in blood feeding and reproduction, 第81回日本寄生虫学会大会, 2012年3月, (兵庫)
11. 田仲哲也, 森寛行, Galay Remil Linggatong, 前田大輝, 白藤(梅宮)梨可, 藤崎幸蔵, フタトゲチマダニにおける宿主血液由来トランスフェリンの動態について, 第153回日本獣医学会学術集会, 2012年3月, (埼玉)
12. Tetsuya Tanaka, Hiroki Maeda, Tomohide Matsuo, Remil Linggatong Galay, Damdinsuren Boldbaatar, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, Naotoshi Tsuji, Kozo Fujisaki, Parasitocidal activity of tick longicin peptide, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月, (横浜)
13. 前田大輝, 田仲哲也, Damdinsuren Boldbaatar, 草木迫浩大, Kyaw Min Aung, Remil Linggatong Galay, 白藤(梅宮)梨可, 玄学南, 藤崎幸蔵, フタトゲチマダニ由来サイクロフィリン A の抗原虫作用, 第64回日本寄生虫学会南日本支部大会・第61回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会, 2011年11月, (宮崎)
14. Tetsuya Tanaka, Hiroki Maeda, Tomohide Matsuo, Damdinsuren Boldbaatar, Rika Umemiya-Shirafuji, Aiko Kume, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, Naotoshi Tsuji, Kozo Fujisaki, Parasitocidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against *Toxoplasma gondii*,

17th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases & Workshop of Gastrointestinal Protozoan Diseases, 2011年9月, (日本)

15. Tetsuya Tanaka, Hiroki Maeda, Tomohide Matsuo, Damdinsuren Boldbattar, Rika Umemiya-Shirafuji, Aiko Kume, Hiroshi Suzuki, Xuenan Xuan, Naotoshi Tsuji, Kozo Fujisaki, Parasitocidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicorn against *Toxoplasma gondii*, TTP7: Ticks and Tick-Borne Pathogens, 2011年8月, (スペイン)
16. 田仲哲也、前田大輝、松尾智英、Damidinsuren Boldbaatar、白藤(梅宮)梨可、玄学南、辻尚利、藤崎幸蔵、フタトゲチマダニロンギシンのトキソプラズマ原虫に及ぼす影響について、第151回日本獣医学会学術集会、2011年3月、(東京)
17. 田仲哲也、松尾智英、Md. Morshedur Rahman, Boldbaatar Damdinsuren、白藤(梅宮)梨可、玄学南、辻尚利、藤崎幸蔵、フタトゲチマダニロンギシン P4 のトキソプラズマに対する抗原虫作用、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月、(兵庫)
18. 田仲哲也、前田大輝、松尾智英、Md. Morshedur Rahman、Boldbaatar Damdinsuren、白藤(梅宮)梨可、玄学南、辻尚利、藤崎幸蔵、フタトゲチマダニロンギシン P4 のトキソプラズマにおける影響、第63回日本寄生虫学会南日本支部大会・第60回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会、2010年11月、(鹿児島)

[図書] (計2件)

1. Tanaka, T., Fujisaki, K. “Tick lysozymes”, in Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education ed. By A. Mendez-Vilas. 査読有 (In press) Formatex Research Center, Spain (2013)
2. Tanaka, T., Xuan X., Fujisaki, K., Shimazaki, K. “Expression and characterization of bovine milk antimicrobial proteins lactoperoxidase and lactoferrin by vaccinia virus” in Infectious diseases in global scenario, ed. By P. K. Roy. 査読有 pp. 249-260 InTech-Open Access Publisher, Croatia (2012)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-infection/sinkoukansan/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田仲哲也 (TANAKA TETSUYA)

鹿児島大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：00322842

(2) 研究分担者

藤崎幸蔵 (FUJISAKI KOZO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：00292095

(3) 連携研究者

玄学南 (XUAN XUENNAN)

帯広畜産大学・原虫病研究センター

研究者番号：10292096