

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658251

研究課題名(和文) マダニ中腸におけるヘム浄化ネットワーク機構の解明

研究課題名(英文) Studies on mechanisms of heme-sewage managements in the tick midgut

研究代表者

辻 尚利 (Naotoshi, Tsuji)

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・動物疾病対策センター生物学的製剤製造グループ・グループ長

研究者番号：70355171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：マダニは唯一の栄養源であるヘモグロビンを吸血によって取り入れる。本研究ではマダニ中腸における加水分解酵素とその阻害剤で構成されヘモグロビン分解経路の存在を明らかにした。特に、吸血に伴って発現が増大するシステインプロテアーゼのマダニカテプシンL-A (HICPL-A) は、ヘム浄化の上方・下方発現等とも密接に関連することが判明した。マダニ特有のヘモグロビン・ヘム代謝機構構成分子は殺ダニ剤の格好の標的分子であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ticks employ a battery of proteases to digest the contents of host blood meals. Host hemoglobin degradation is facilitated by proteolytic networks in the midgut, the first major region of the body where ingested blood comes in to contact with the tick's internal tissues. The present study revealed existence of hemoglobin degradation pathway which consists of proteolytic enzymes and their inhibitors within the midgut epithelium. In particular, expression of a cathepsin L-like cysteine protease, isolated from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* (HICPL-A) is correlated with Hb digestion. Up and down-regulation of heme-sewage metabolism is essential for the survival of ticks, since blood meals from hosts are the only source of energy, suggesting that this pathway may be suitable drug targets for better control of ticks and tick-borne diseases.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：獣医学 感染症 吸血性節足動物 マダニ ヘモグロビン ヘム

1. 研究開始当初の背景

(1) 急務となっている現行殺ダニ剤に代わる新たなマダニ制圧技術の開発

吸血と疾病媒介による被害が国内外において甚大なマダニの防除対策は、健全な家畜生産と畜産物の生産性向上に直結するだけでなく、伴侶動物の健康保持増進にも不可欠である。しかし、現状で唯一の防除手段であるいわゆる”殺ダニ剤”による対策は、薬剤抵抗性マダニの出現や、残留薬剤による環境・食物連鎖の汚染などの深刻な問題点を指摘されている。現行の化学的薬剤に代わる、清浄化を永続的に維持できる効果的なマダニ防除技術の開発が急がれている。

(2) 殺ダニ剤開発の問題

殺ダニ剤のほぼ全ては農薬の転用・流用にすぎない実態が、世界的に半世紀以上も継続していることが現在抱えている薬剤耐性マダニ、残留問題などの弊害を招いている。本来、抗マダニ薬開発は対象であるマダニに特有の生理や分化・繁殖の特性に立脚することを基盤とすべきで、この原則から大きく逸脱した開発状況を早急に転換する必要がある。

(3) 抗マダニ薬開発のための新たな研究プラットフォームの構築

マダニなどの寄生体は、宿主が保有しない代謝系を進化的に発達させ、自己の生活環を維持してきている。近年、こうした特異性だけを狙って作用する分子標的薬の考えが導入され、立体構造情報に基づいた化合物が次世代の抗寄生虫薬として期待されている。我々は、マダニ吸血行動の分子基盤を解明する中で、血液消化を担当する中腸には宿主血液の主要構成成分であるHbのグロビン断片をアミノ酸へと段階的に分解する精妙な経路

(Hb分解経路)が存在することを明らかにし、この経路への参画分子が抗マダニ薬の標的になり得ることを見出した。しかし、成ダニでこれら参画分子をノックダウンしても吸血は完全に阻止されず、ほぼ半数の個体で飽血と産卵は正常であったことから、より遮断効果の優れた代謝経路の選抜が必要となっている。

2. 研究の目的

(1) マダニ中腸に構築されているヘモグロビン分解経路の論理的解明:好氣的な生命活動を維持する上で必須なヘムは、多くの生物が自ら作りだしているが、ヘム合成経路を保有しないマダニは、吸血で摂取した宿主ヘモグロビンの分解産物である遊離ヘムに依存している。本研究は、殺ダニ剤に代わる新たな抗マダニ薬の標的

分子を発掘するために、有毒な遊離ヘムを無毒化する中腸に構築されたマダニ特有のヘム浄化の応答機構を明らかにする。得られた知見は、薬剤標的経路としてすでに解明が進んでいるHbのグロビン断片分解経路(Hb分解経路)との融合によって、マダニ生活環を完全に遮断する抗マダニ薬の開発を可能にする。

(2) ヘム浄化機構を支える分子群を標的として抗マダニ薬の開発:マダニ中腸上皮細胞におけるヘム浄化に参画する分子の応答機構の解明し、ヘム浄化ネットワークを論理的に記述すること。

3. 研究の方法

(1) システインプロテアーゼのカテプシンL-A(H1CPL-A)ノックダウンマダニの作出:H1CPL-AをコードするdsRNA血体腔に注入し、日本白色種ウサギ-フタトゲチマダニの感染系に耳袋法を用いて、吸血から飽血に至るマダニ個体の表現型を観察し、産下卵を回収した(図1)。

図1. 本研究で用いた日本最優占マダニのフタトゲチマダニ。吸血開始後3日目の雌成ダニ。



(2) 定量PCRを用いてグロビン断片分解経路参画分子の発現動態を調べた。

(3) グロビン断片分解経路参画分子の特異抗体と免疫蛍光抗体法をもちいて、マダニ中腸上皮細胞における内在性グロビン断片分解経路参画分子の局在を調べた。

4. 研究成果

(1) H1CPL-A発現抑制によって惹起された吸血不全:H1CPL-Aノックダウンマダニの飽血率は50%で対照群と比較して有意に減少し、飽血体重も約30%減少した。

(2) 中腸上皮細胞及び内腔の変化:H1CPL-Aノックダウンマダニの上皮細胞は対照群と比較して顕著な変化は確認されなかったが、内腔にはエオジン好性の顆粒が認められた。一方、H1CPL-AノックダウンマダニではdsRNAによってH1CPL-A遺伝子の発現抑制が確認され、内在性の蛋白発現も顕著に減少していることが分かった(図2,3,4)。

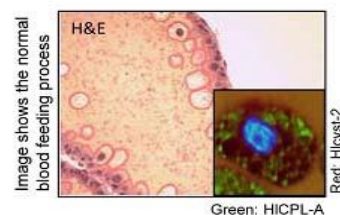


図 2. 無処置マダニの小腸内腔 (H&E 染色) と中腸上皮細胞における HICPL-A とそのインヒビター Hlcyst-2 の共局在.

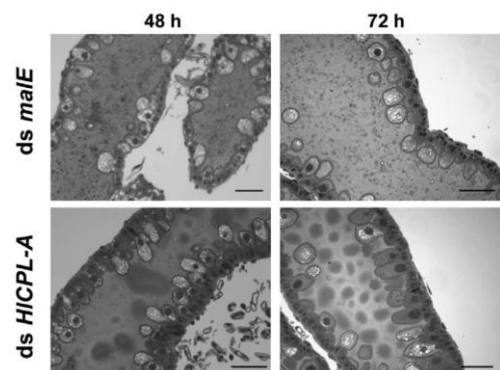


図 3. HICPL-A ノックダウンマダニで観察された中腸内腔のエオジン好性の硝子滴. 黒線: 100 μ m.

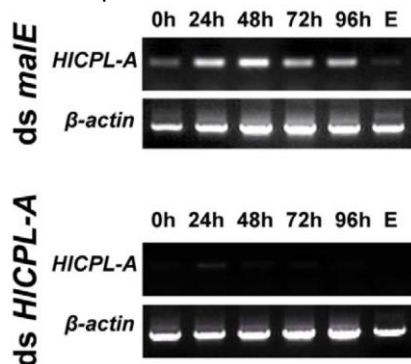


図 4. 吸血経過における HICPL-A 遺伝子発現変動.

吸血によって HICPL-A の発現は増加するが、HICPL-A ノックダウンマダニでは発現が抑制された。

(3) HICPL-A ノックダウンマダニにおけるグロビン断片分解経路参画分子の発現は、遺伝子発現及び内在性発現レベルにおいて、加水分解酵素やそのインヒビターで不規則な発現の変化が認められ、対照群とは全く異なった発現動態を示し、グロビン断片分解経路に破綻が生じていることが示された (図 5)。

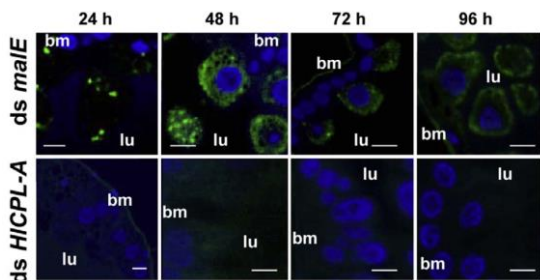


図 5. 吸血経過における内在性 HICPL-A の変動.

緑色蛍光: 内在性 HICPL-A, 青: 核, malE: 対照, bm: basal membrane, lu: midgut lumen.

白線: 25 μ m.

(4) システインプロテアーゼなどの各種加水分解酵素とセリンプロテアーゼインヒビターなどの各種インヒビターからなるヘモグロビンの段階的分解経路を明らかにした (図 6)。

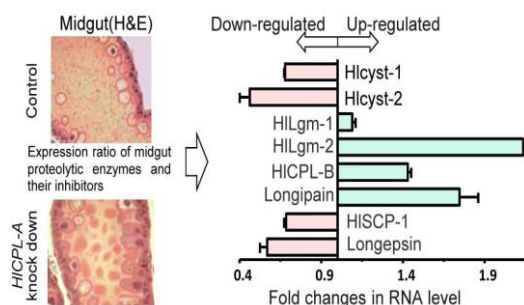


図 6. 加水分解酵素とそれら阻害剤の連動で制御されているマダニ吸血.

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)

- Galay RL, Umemiya-Shirafuji R, Bacolod ET, Maeda H, Kusakisako K, Koyama J, Tsuji N, Mochizuki M, Fujisaki K, Tanaka T. (2014) Two kinds of ferritin protect ixodid ticks from iron overload and consequent oxidative stress. PLoS One. 査読有, 9(3), e90661. DOI: 10.1371/journal.pone.0090661.
- Yamaji K, Miyoshi T, Hatta T, Matsubayashi M, Alim MA, Anisuzzaman, Kushibiki S, Fujisaki K, Tsuji N. (2013) . HICPL-A, a cathepsin L-like cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, modulated midgut proteolytic enzymes and their inhibitors during blood meal digestion. Infect Genet Evol. 査読有, 16C, 206-211. Doi: 10.1016/j.meegid.2013.01.018

[学会発表] (計 5 件)

- 辻 尚利. マダニの吸血生理. 平成25年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会. 2014年2月21日. 幕張メッセ (千葉市)
- 八田 岳士, 松林 誠, 三好 猛晴, アニスザマン, アリム アブドウル, 藤崎 幸蔵, 辻 尚利. マダニアレイ解析による Leucine rich-repeat (LRR) protein-homolog遺伝子の検出. 第11回分子寄生虫・マラリアフォーラム. 2013年10月2日. 長崎熱帯医学研究所 (長崎市)
- Anisuzzaman, 三好 猛晴, 八田 岳士,

- 松林 誠, Khyrul Islam, Abdul Alim, 藤崎 幸蔵, 辻 尚利. Longistatin efficiently modulates inflammation during tick's feeding by antagonizing RAGE, a multi-ligand receptor. 第11回分子寄生虫・マラリアフォーラム. 2013年10月2日. 長崎熱帯医学研究所(長崎市)
- ④ アニスザマン, 三好 猛晴, 八田 岳士, 松林 誠, イスラム カイルル, アリム アブドゥル, 藤崎 幸蔵, 辻 尚利. マダニロンギスタチンのRAGE 吸着を介した宿主炎症反応の抑制. 第82回日本寄生虫学会. 2013年3月29日. 東京医科歯科大学湯島キャンパス(文京区)
- ⑤ 八田 岳士, 三好 猛晴, 松林 誠, アニスザマン, アリム アブドゥル, 山地佳代子, 五十嵐郁男, 藤崎 幸蔵, 辻 尚利. 人工吸血法により作出したバベシア原虫感染マダニの中腸 mRNA-seq 解析. 第10回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム2012年10月12日. 群馬大学医学部(前橋市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.niah.affrc.go.jp/collab/person/tsuji/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 尚利 (TSUJI NAOTOSHI)

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・動物疾病対策センター生物学的製剤製造グループ・グループ長

研究者番号：70355171

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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・細菌・寄生虫研究領域・主任研究員

研究者番号：00455304