

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850198

研究課題名(和文) マダニの生存を支配する栄養代謝ネットワークの解明

研究課題名(英文) Studies on the nutrient sensing mechanisms and pathways in the tick *Haemaphysalis longicornis*

研究代表者

白藤 梨可 (SHIRAFUJI, Rika)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教

研究者番号：00549909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：栄養環境の応答に関わるシグナル伝達が、飢餓時ならびに飽血時のマダニの生存を制御する最も重要な現象である点に着目し、栄養代謝に関わる分子の機能解明を試みた。(1)ヒストン脱アセチル化酵素Sir2をコードする遺伝子の相同遺伝子HISIRT5およびHISIRT7を単離同定することに成功した。(2)RNAiにより、オートファジー関連遺伝子はマダニの卵形成だけでなく胚発生時においても重要な役割を担うことが明らかになった。(3)AMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)についてRNAiを実施した結果、吸血後に活性化される栄養シグナル伝達にはAMPKは関与しないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that nutrient sensing mechanisms and pathways are critical events for survival of ticks during both nonfeeding (starvation) and feeding (engorgement) periods. In this study, role(s) of some molecules which are known as regulators of cellular metabolism in eukaryotes were examined. (1) Two homologs (HISIRT5 and HISIRT7) of Sir2 histone deacetylase gene were identified from the tick, *Haemaphysalis longicornis*. (2) RNAi experiments revealed that autophagy-related genes play important roles in not only oogenesis, but embryogenesis as well. (3) The results of RNAi suggested that AMPK might be not activated during feeding period.

研究分野：節足動物衛生工学

キーワード：マダニ 栄養シグナル伝達 RNA干渉法 飢餓 吸血

1. 研究開始当初の背景

吸血性節足動物であるマダニは、獣医・医学上極めて重要な外部寄生虫であり、マダニがもたらす家畜、野生動物、伴侶動物、ヒトへの加害は世界中の脅威となっている。その加害は、吸血による直接的加害と、吸血によって媒介する多種多様な病原体(細菌、ウイルス、原虫など)による間接的加害とがあり、後者がより深刻である。例えば、マダニが媒介する原虫による小型ピロプラズマ症は、我が国の放牧牛における重要な疾病であるが、感染・発病を阻止するワクチンはなく、媒介者であるマダニに対する対策が急務となっている。しかし、殺ダニ剤を用いた現行の制圧法は、薬剤耐性マダニの出現、環境保全問題等の観点から多くの問題をはらんでいる。

2. 研究の目的

マダニが栄養分を獲得できる機会は一生の中で3回のみであり、数年間におよぶ生存期間の大半を未吸血・飢餓状態で過ごす。その一方で、吸血時には大量の血液を摂取し、吸血完了時の体重は吸血前の約100倍にも達する。本研究では、このユニークなマダニの生態を支える「栄養代謝ネットワーク」に着目した。これまでに得られた研究成果を基盤として、本研究課題を推進することにより、オートファジー関連遺伝子、Akt、TORなどの栄養代謝に関わる分子の機能解明を図り、マダニに対する新規かつ効果的な防圧策の開発に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* (単為生殖系) とその Expressed sequence tag (EST) データベース、遺伝子発現抑制(ノックダウン)マダニを主要な研究材料として、以下の項目について研究を推進した。

(1) 栄養シグナル伝達経路に関与する新規遺伝子の単離:

フタトゲチマダニ EST データベースの利用ならびに RACE 法により、栄養シグナル伝達に関与すると推測される新規遺伝子の単離を試みた。

(2) 栄養シグナル伝達経路構成分子をコードするフタトゲチマダニ遺伝子の機能解明:

本研究において新規に単離したヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 (silent information regulator 2) の相同遺伝子、ならびに、単離同定済みのオートファジー関連遺伝子について、発育ステージ別(卵、幼ダニ、若ダニ、成ダニ) 吸血前・後の雌ダニ各臓器における発現動態をリアルタイム PCR により解析した。また、RNA 干渉法 (RNAi) を実施し、各遺伝子の機能解明を図った。

(3) 栄養シグナル伝達経路を活性化させるトリガー因子の探索:

牛赤血球と血清を様々な割合で混合し、各々を人工吸血法により雌ダニに摂取させ、表現型の解析を行った。また、細胞内のエネルギーセンサーである AMP キナーゼ (AMPK) について、フタトゲチマダニより相同遺伝子を既に得ており、その特性解明を実施した。

(4) マダニにおけるオートファジーと Akt/TOR 経路との関連性

モデル生物では、飢餓状態では、TOR の不活化によってオートファジー関連タンパク Atg13 が脱リン酸化することにより、オートファジーが誘導される。そこで、degenerate PCR 法によるオートファジー関連遺伝子 *ATG13* のフタトゲチマダニ相同遺伝子の単離を試みた。

4. 研究成果

(1) 栄養シグナル伝達経路に関与する新規マダニ遺伝子の単離:

フタトゲチマダニ EST データベースを用い、リボソームタンパク S6 ならびにヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 をコードする遺伝子の相同遺伝子を単離した。

(2) 栄養シグナル伝達経路構成分子をコードするフタトゲチマダニ遺伝子の機能解明:

Sir2 について、フタトゲチマダニ発育胚 cDNA ライブラリーより、全長 cDNA を得た。Sir2 に相同な2つの遺伝子について BLAST 解析を行った結果、*SIRT5* および *SIRT7* に相同な遺伝子であることが判明した。*H. longicornis SIRT5 (HISIRT5)* の cDNA は全長 3,015 bp、ORF は 891 bp であり、推定産物は 296 アミノ酸から構成され、その分子量は 31.9 kDa と推測された。一方、*H. longicornis SIRT7 (HISIRT7)* の cDNA は全長 2,695 bp であり、ORF は 1,320 bp であった。推定産物は 439 アミノ酸から構成され、その分子量は 31.9 kDa であると推測された。さらに、リアルタイム PCR による遺伝子発現解析を行った結果、*HISIRT7* 遺伝子は、雌ダニの中腸、卵巣、唾液腺において吸血後に発現上昇し、脂肪体においては吸血前後で発現が変動しない傾向にあることが明らかになった。単離済みのオートファジー関連遺伝子 (*HIATG3*, *HIATG4*, *HIATG8*, *HIATG12*) について、卵巣および卵における詳細な遺伝子発現解析を実施した。未吸血、吸血 2 日目・4 日目、飽血、産卵前、産卵期の雌ダニ卵巣ならびに、産卵開始~終了まで経日的に回収した卵について total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現解析を実施した。その結果、卵巣における *HIATG* 遺伝子発現は飽血後に上昇し、産

卵期には最も高いレベルに達することが判明した。一方、卵においては、発育の進行に伴い *HIATG* 遺伝子の発現レベルが低下した。これらのことから、*HIATG* 遺伝子は母性 mRNA であり、卵形成あるいは胚発生時において重要な役割を果たすことが推測された。これらの研究成果は *Veterinary Parasitology* 誌に受理・掲載された（雑誌論文（2））。

HIATG3, *HIATG4*, *HIATG8*, *HIATG12* のそれぞれについて RNAi を実施し、卵形成と胚発生に対する影響を検証した。その結果、*HIATG3* ノックダウン雌ダニが産出した卵において発育が阻害され、また、孵化阻害も認められた。*HIATG12* ノックダウン雌ダニでは、その半数が飽血時に死亡し、生存した半数の雌ダニは産卵したものの、それらの卵は孵化に至らなかった。*HIATG4* および *HIATG8* ノックダウン雌ダニについては、対照群と同様の表現型を示した。これらの結果は、マダニの胚発生にはオートファジー関連遺伝子 *HIATG3* および *HIATG12* が必要不可欠であることを示唆する。なお、卵母細胞の発育には、卵黄タンパク質前駆体（ビテロジェニン；Vg）の合成と取り込みが必須である。先行研究において、*HIATG6* が Vg 取り込みに関与する遺伝子であることを明らかにしている（Kawano, Umemiya-Shirafuji et al., 2011）が、本研究の遂行により、*HIATG3*, *HIATG4*, *HIATG8*, *HIATG12* は *HIATG6* と異なり、それらのプロセスには関与しないことが明らかになった。したがって、Akt/TOR 経路の活性化により始動する Vg 合成は、オートファジーによる正の調節を受けない可能性が示唆された。*HIATG3* および *HIATG12* は卵母細胞内における Vg のプロセシング経路や胚発生時の組織リモデリングにおけるアポトーシスなどにおいて何らかの役割を果たしているのかもしれない。

HIATG6 遺伝子について 200 bp 以下の dsRNA を合成し、雌ダニに注入し、ノックダウンの誘導を試みたが、対照群との表現型において有意差は認められず、600 bp 以上の長鎖 dsRNA を用いた際に観察された産卵異常（Kawano, Umemiya-Shirafuji et al., 2011）は観察されなかった。マダニの RNAi においては、400 bp 程度の dsRNA が有効とされており、短鎖 dsRNA のインジェクションではノックダウン効果が低いと言われている。同様の結果が本研究においても得られ、特に、200 bp 以下の dsRNA を用いた場合、マダニにおいてはノックダウン効果を十分に得ることができないことが判明した。

これらの成果は、オートファジー関連遺伝子の機能阻害が飢餓マダニの生存のみならず、マダニ卵形成ならびに胚発生の異常を誘導するという現象を利用した、新たなマダニ制圧法開発のための重要な知見に

なると期待される。

（3）栄養シグナル伝達経路を活性化させるトリガー因子の探索：

牛赤血球と血清を様々な割合で混合し、人工吸血法により雌ダニに摂取させ、表現型解析を実施した。その結果、飽血体重、卵重量、卵の孵化率について対照群と実験群との間に有意差は認められなかったが、赤血球に対する血清の割合が高いほど、雌ダニが産出した卵の着色度が低下した。摂取赤血球量、つまりマダニ体内のヘモグロビン（Hb）量の減少が、卵黄タンパク質（ビテリン）が保有するヘム量の減少をもたらした。その結果として卵の色が退色したと推測された。しかしながら、これらの卵は正常に発育し、孵化に至った。したがって、吸血開始から急速吸血期までの間に十分なヘモグロビンを摂取し、かつ、産卵を誘導しうる体重（critical weight）に達することにより、卵形成と胚発生が進行することが明らかとなった。ヘモグロビンの栄養シグナル伝達経路ならびに卵黄タンパク質前駆体合成経路への関与等について研究を進めている。

AMPK について、遺伝子発現解析ならびに RNAi を実施した。雌ダニの唾液腺、中腸、脂肪体においては、吸血開始後に AMPK 遺伝子発現レベルが上昇し、飽血後に低下した。臓器別の比較では、吸血の前後に関わらず卵巣において AMPK 遺伝子発現レベルが最も高いことが明らかになった。次いで、雌ダニに対し RNAi を実施したところ、RNAi 群のマダニは対照群と同様に吸血、産卵を行い、表現型に有意な差は認められなかった。AMPK は真核細胞に高度に保存されているセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞内のエネルギーセンサーとして重要な役割を担っている。AMPK は、カロリー制限、低グルコース、低酸素などの際に細胞内エネルギー（アデノシン三リン酸；ATP）が減少すると活性化するキナーゼである。したがって、吸血時および吸血後のマダニは富栄養状態にあり、AMPK 活性は低いと推察される。今回の RNAi で観察された表現型は予想通りの結果であり、かつ、吸血後に活性化される栄養シグナル伝達には AMPK は関与しないことが確認された。今後は、飢餓マダニを用いた RNAi を実施し、飢餓時に始動する栄養シグナル伝達経路における AMPK の役割を明らかにする予定である。また、フタトゲチマダニ AMPK（HIAMPK）の組換えタンパク質を大腸菌発現系にて作製し、分子量約 53 kDa の可溶性タンパク質を得た。精製した組換え HIAMPK をマウスに免疫中であり、得られた抗血清をタンパク質発現解析ならびに免疫組織化学的解析に使用する予定である。

(4) マダニにおけるオートファジーと Akt/TOR 経路との関連性

degenerate PCR 法によるオートファジー関連遺伝子 *ATG13* のフタトゲチマダニ相同遺伝子の単離を試みたが、本研究期間内では単離同定には至らなかった。

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 15 件)

- (1) Klionsky DJ, Umemiya-Shirafuji R (2,467 名中 2,145 番目). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12: 1-222. 査読有.
doi: 0.1080/15548627.2015.1100356.
- (2) Umemiya-Shirafuji R, Galay RL, Maeda H, Kawano S, Tanaka T, Fukumoto S, Suzuki H, Tsuji N, Fujisaki K. Expression analysis of autophagy-related genes in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Vet. Parasitol.* 2014; 201:169-175. 査読有.
doi: 10.1016/j.vetpar.2014.01.024.
- (3) 白藤梨可. 小型ピロプラズマ病対策のためのマダニコントロール「ベクターとしてのマダニ: 徹底解剖」臨床獣医 2014; 32: 16-20. 査読無.
<http://www.pet-honpo.com/magazine/insyo/post-487/>

[学会発表](計 17 件)

- (1) 三原 涼、白藤(梅宮) 梨可、阿部 靖之、川野 優、松尾智英、藤崎 幸蔵、鈴木 宏志. フタトゲチマダニ単為生殖系における卵巣および卵母細胞の発育. 第 24 回日本ダニ学会東京大会. 2015 年 9 月 12 日. 法政大学(東京都千代田区).
- (2) 川野 優、白藤(梅宮) 梨可、藤崎 幸蔵、鈴木 宏志. フタトゲチマダニオートファジー関連遺伝子 *HIATG6* の発現抑制が卵形成機構に与える影響について. 第 157 回日本獣医学会学術集会. 日本獣医寄生虫学会. 2014 年 9 月 10 日. 北海道大学(北海道札幌市).
- (3) 白藤(梅宮) 梨可、Damdinsuren Boldbaatar、Min Liao、Banzragch Battur、Morshedur Md. Rahman、Thasaneeya Kuboki、Remil Linggatong Galay、田仲 哲也、藤崎幸蔵. フタトゲチマダニ脂肪体の卵黄タンパク質前駆体合成における target of rapamycin (TOR) の役割. 第 83 回日本寄生虫学会大会. 2014 年 3 月 28 日. 愛媛大学 城北キャンパス(愛媛県松山市).
- (4) Rika Umemiya-Shirafuji, Suguru Kawano,

Remil Linggatong Galay, Hiroki Maeda, Aiko Kume, Tetsuya Tanaka, Hiroshi Suzuki, Kozo Fujisaki. Expression profiles of autophagy-related genes in the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. 24th International Congress of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 2013. August 25-29. The Perth Convention and Exhibition Centre (Perth, Australia).

[その他]

帯広畜産大学 原虫病研究センター 研究業績:

<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/gyos eki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白藤 梨可 (SHIRAFUJI, Rika)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教
研究者番号: 00549909