

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660229

研究課題名(和文)人工ヌクレアーゼTALENを用いた遺伝子ノックアウトマダニ感染症モデルの作出

研究課題名(英文)The preparation of gene knock out tick by TALEN using nuclease for infectious model

研究代表者

田仲 哲也(TANAKA, TETSUYA)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授

研究者番号：00322842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マダニの遺伝子機能の解析ではRNA干渉法による遺伝子破壊が用いられてきたが、ノックアウトやトランスジェニックの技術は導入されていない。そこで、我々はこれらの技術を確立する基盤として遺伝子導入マダニ細胞の作製を行った。プラスミドのマダニ細胞のトランスフェクション効率では、pmiGLO並びにpCAGGS-Luciferaseが高いルシフェラーゼ活性を示したが、フタトゲチマダニ由来である、アクチンプロモーター並びにフェリチンプロモーターのマダニ細胞でのルシフェラーゼ活性は低かった。将来的にはこれらの研究手法によって、遺伝子ノックアウトやトランスジェニックマダニ作製の突破口となる。

研究成果の概要(英文)：Although tick studies were conducted by gene silencing using RNA interference for analyzing the gene function of tick, the skills of gene knockout and gene transgenic for ticks have not been developing at the moment. Therefore, we tried to incorporate foreign gene into the tick cell line for establishing gene engineering. Although the effect of gene plasmid transfection into the tick cell line showed high luciferase activity using pmiGLO or pCAGGS-Luciferase, the effect of plasmid transfection into the tick cell line showed low luciferase activity using actin or ferritin promoter. These studies indicated that the foreign gene incorporated into the tick may make a breakthrough in the preparation of gene knockout or transgenic tick.

研究分野：節足動物分子工学

キーワード：マダニ マダニ細胞 アクチンプロモーター フェリチンプロモーター CAGプロモーター PGKプロモーター

1. 研究開始当初の背景

感染症の対策は世界的急務

医薬技術の進歩や衛生環境の改善が劇的に進んだ現在においても、未だ多くの感染症が世界中に蔓延している。感染性疾患を大別すると、インフルエンザなどのウイルス性感染症、出血性大腸菌 O-157 などの細菌性感染症、マラリアといった寄生虫による感染症に分類される。近年、新型インフルエンザウイルスやマダニが媒介する重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) などの新興感染症が数多く出現しており、このような感染症には従来のワクチン療法では対応が後手となり、有効な対策が存在しない状況である。

動物モデルを用いた病原体 宿主相互作用の解明

感染症の新しい予防・治療法のシーズとして、病原体と宿主間で成立する相互関係に注目が集まっている。感染症の本質は、病原体と個体に存在する「寄生する・寄生される」といった単純な生物学的関係といえる。もし仮に、感染症に関わる宿主因子や病原体の因子が明らかとなり、そこから宿主病原体相互作用が理解できれば、その調節はおのずと応用面へと結びつくと期待される。その宿主病原体相互作用を研究するための感染症モデル動物として、これまではマウスやラットなどの哺乳類が広く用いられてきた。これらのモデル動物では、主に自然免疫や獲得性免疫の分子機構が中心に研究されている。

病原体感染症動物モデルの問題点

哺乳類をモデルとして用いた実験系では、物理的・経済的見地から扱える個体数に限りがあり、加えて動物実験に関する倫理規制の高まりから、病原体の感染実験によりマウスやラットを死に至らしめることがほぼ不可能になりつつある。すなわち、哺乳類個体を用いた感染実験には厳しい制約が付きまとい、個体レベルでの解析が必要不可欠である病原体 宿主相互作用をターゲットにした研究は、年々その実行が難しくなっているのが現状である。

遺伝子ノックアウトマダニを用いた病原体感染症モデルの確立は斬新なチャレンジである

節足動物に関連してこれまでのショウジョウバエの研究からあるように、多くの病原体が哺乳類における感染と同様の経路をめぐり増殖を行い、ショウジョウバエに対して病原性を示すことが明らかとなってきている (Valanne ら, J Immunol, 2011)。マダニも同様に獲得性免疫のようなメモリー式の免疫システムを持ち合わせておらず、リゾチームやディフェンシンなどの抗菌性タンパク質や貪食を介した自然免疫の 1 次的防御的役割によって病原体を排除するため、感染時に常に“未知の病原体”と対峙していると考えられる。これはいわば、新興感染症に感染した場合とよく似ている。つまり、マダニに対し病原体を人工的に感染させる行為は、獲

得性免疫が機能し難い新興感染症を模倣していると考えることが可能である。

2. 研究の目的

これまで、マダニの目的遺伝子破壊において我々が用いてきた方法が RNA 干渉 (RNAi) 法である。マダニでの RNAi 法は大変簡便であり、かつ高効率に標的遺伝子の機能を低下させることが可能である。しかし、RNAi 法では、標的 mRNA を完全に分解することができず、ある一定の割合で遺伝子の機能が残存し、標的遺伝子や表現型の解析が困難となる場合がある。そのため、マダニにおいて標的特異的に変異を導入しノックアウトを得る方法や、標的特異的に外来遺伝子を導入するノックインの技術の開発が望まれている。そのような目的遺伝子の改変技術がマダニにおいて可能になれば、遺伝子機能解析の強力なツールになると考えられる。そこで、我々は遺伝子ノックアウトマダニ細胞やノックアウトマダニの作製を行い、これらのマダニに病原体を感染させ、遺伝子ノックアウトマダニ感染症モデルの確立を目指すことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

アクチンプロモーター (AP)、フェリチンプロモーター (FP) の同定とルシフェラーゼ並びにヴィーナスを組み込んだプラスミドの作製

本研究では、フタトゲチマダニ体内で多く転写されている可能性があるアクチンおよび細胞内型フェリチンのプロモーター配列を同定し、それらを用いてルシフェラーゼ発現プラスミド AP-Luc-pBlue、FP-Luc-pBlue と Luc-pBlue を作製した。また、哺乳類細胞の発現ベクターである pCAGGS、pEF-BOS、pcDNA3.1 (+) と昆虫細胞の発現ベクターである pIEx のマルチクローニングサイトにホタルルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子を組み込んだプラスミド pCAGGS-Luc、pEF-Luc、pcDNA-Luc、pIEx-Luc を作製した。pCAGGS については蛍光タンパク質をコードする Venus 遺伝子を組み込んだ pCAGGS-Venus を作製した。

マダニ ISE6 細胞へのトランスフェクション効率の検討

pCAGGS-Luc または pCAGGS-Venus プラスミドを用いて、ISE6 細胞へのトランスフェクション効率を検討した。pCAGGS-Luc はルシフェラーゼアッセイを行い、pCAGGS-Venus は蛍光顕微鏡で蛍光を観察した。実験には 24 穴プレートを用い、細胞をプレートに撒いた後、24 時間 34℃ で培養し、その後トランスフェクションを行った。

アクチンプロモーター、フェリチンプロモーター、PGK プロモーターのプロモーター活性比較

マダニ細胞 BME26 でプロモーター活性を示す pmiGLO プラスミドの PGK プロモーター

(PP)を、Luc-pBlue に組みこむ PP-Luc-pBlue を作製した。アクチンプロモーターを含む AP-Luc-pBlue、フェリチンプロモーターを含む FP-Luc-pBlue、PP-Luc-pBlue をそれぞれ用いて、最適条件下で ISE6 細胞へトランスフェクションし、プロモーター活性を比較した。ネガティブコントロールとして Luc-pBlue を用い、各プラスミドのルシフェラーゼ活性がネガティブコントロールの何倍になっているかを計算した。

4. 研究成果

アクチンおよびフェリチンプロモーター配列の同定

アクチンおよびフェリチンのイントロンを含む配列を同定した。これらをもとにアクチンおよびフェリチンの上流配列、1373 bp 並びに 2906 bp の DNA 配列を決定し、promoter 2.0 Prediction server によって解析を行った。その結果、アクチンプロモーターのスコアが 1.253、フェリチンプロモーターのスコアが 1.185 であった。スコアが 1 以上であればプロモーター配列である可能性が高いとされており、同定したそれぞれの DNA 配列はプロモーター配列である可能性が高いことが判明した。

ISE6 細胞へのトランスフェクション効率

ISE6 細胞へのトランスフェクションの効率を蛍光顕微鏡を用いて Venus の発現によって検討したところ、ISE6 細胞へのトランスフェクションの最適条件は、細胞数は 1 ウェルあたり 5.0×10^5 個、トランスフェクションのプラスミド量は 1.5 μg 、トランスフェクション後の培養日数は 4 日間必要であることが分かった。

ルシフェラーゼ発現プラスミドの活性比較

最適条件下では、ISE6 細胞におけるルシフェラーゼ活性は、活性が高い順に pmiGLO、pCAGGS-Luc、pEF-Luc、pcDNA-Luc、PP-Luc-pBlue、AP-Luc-pBlue、FP-Luc-pBlue、PIEX-Luc、Luc-pBlue となった(図. 1)。

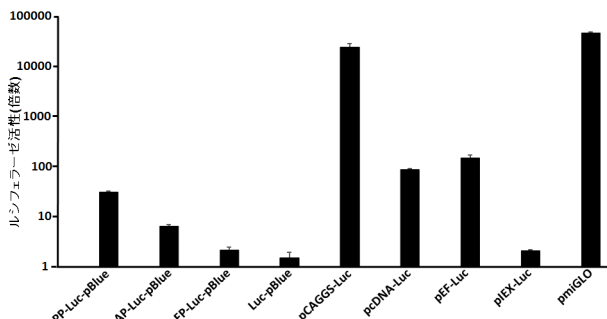


図1 ISE6細胞のルシフェラーゼ活性 PGKプロモーター、アクチンプロモーター、フェリチンプロモーター間の活性比較

ISE6 細胞におけるプロモーター活性は高い順に PGK プロモーターがネガティブコントロールの 7.2×10^2 倍、アクチンプロモーターが 1.5×10^2 倍、フェリチンプロモーターが

5.0 倍となった(図. 1)。

得られた成果と今後の展望

プラスミドの ISE6 細胞のトランスフェクション効率では、pmiGLO と pCAGGS-Luc が特に高いルシフェラーゼ活性を示したが、フタトゲチマダニ由来プロモーターである、アクチンプロモーター並びにフェリチンプロモーターの ISE6 細胞でのルシフェラーゼ活性は低かった。しかし、ISE6 細胞はフタトゲチマダニ由来細胞ではないことを考えると、フタトゲチマダニ体内でアクチンプロモーターやフェリチンプロモーターが効率よく働く可能性も否定できない。

今後は pmiGLO や pCAGGS プラスミドをマダニ卵に導入する方法を確立する必要がある。すなわち、マダニ卵へのプラスミド導入が成功すれば、マダニの遺伝子組換え技術が確立できることが予想される。

将来的にはこれらの研究手法によって、人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集によるノックアウトやトランスジェニックマダニ作製の突破口となる。遺伝子ノックアウトやトランスジェニックマダニを病原体感染症モデルとして利用することは、マダニ媒介性病原体とマダニの相互関係についてより深い知見が得られる。また、ウイルス、細菌、原虫などの未知の病原体による新興感染症における病原体 宿主相互作用の解明に有効活用できることが考えられる。

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12件)

- Galay, RL., Hernandez, EP., Talactac, MR., Maeda, H., Kusakisako, K., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Induction of gene silencing in *Haemaphysalis longicornis* ticks through immersion in double-stranded RNA. Ticks Tick Borne Dis. 査読有 (In press) (2016)
- Kusakisako, K., Masatani, T., Yada Y., Talactac, MR., Hernandez, EP., Maeda, H., Mochizuki, M., Tanaka, T. Improvement of the cryopreservation method for the *Babesia gibsoni* parasite by using commercial freezing media. Parasitol. Int. 査読有 (In press) (2016)
- Talactac, MR., Yoshii, K., Maeda, H., Kusakisako, K., Hernandez, EP., Tsuji, N., Fujisaki, K., Galay, RL., Tanaka, T., Mochizuki, M. Virucidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against tick-borne encephalitis virus surrogate Langat virus. Parasit. Vectors 査読有 9 (1): 59 (2016)

4. Galay, RL., Takechi, R., Umemiya-Shirafuji, R., Talactac, MR., Maeda, H., Kusakisako, K., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Impaired cellular immune response to injected bacteria after knockdown of ferritin genes in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. Parasitol. Int. 査読有 65 (3): 251-257 (2016)
 5. Maeda, H., Miyata, T., Kusakisako, K., Galay, RL., Talactac, MR., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. A novel C-type lectin with triple carbohydrate recognition domains has critical roles for the hard tick *Haemaphysalis longicornis* against Gram-negative bacteria. Dev. Comp. Immunol. 査読有 57: 38-47 (2016)
 6. Kusakisako, K., Masatani, T., Miyata, T., Galay, RL., Maeda, H., Talactac, MR., Tsuji, N., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Functional analysis of recombinant 2-Cys peroxiredoxin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. Insect Mol. Biol. 査読有 25 (1): 16-23 (2016)
 7. Takechi, R, Galay, RL, Maeda, H, Matsuo, T., Kusakisako, K., Talactac, MR., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Role of the tumor necrosis factor receptor-associated factor-type zinc finger domain containing protein 1 (TRAFD1) from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* in immunity against bacterial infection. Ticks Tick Borne Dis. 査読有 7 (1): 36-45 (2016)
 8. Kusakisako, K., Maeda, H., Galay, RL., Matsuo, T., Tsujio, M., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K. and Tanaka, T. The vector potential of *Haemaphysalis longicornis* ticks for *Babesia microti* parasites under experimental condition. J. Protozool. Res. 査読有 25: 8-17 (2015)
 9. Maeda, H., Kurisu, K., Miyata, T., Kusakisako, K., Galay, RL., Talactac, MR., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Identification of the *Babesia*-responsive leucine-rich repeat domain-containing protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. Parasitol. Res. 査読有 114 (5): 1793-1802 (2015)
 10. Mori, H., Tanaka, T., Mochizuki, M. The widely distributed hard tick, *Haemaphysalis longicornis*, can retain canine parvovirus but not be infected in laboratory condition. J. Vet. Med. Sci. 査読有 77 (4): 405-411 (2015)
 11. Galay, RL., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Iron metabolism in hard ticks (Acari: Ixodidae): The antidote to their toxic diet. Parasitol. Int. 査読有 64 (2): 182-189 (2015)
 12. Galay, RL., Miyata, T., Umemiya-Shirafuji, R., Maeda, H., Kusakisako, K., Tsuji, N., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Evaluation and comparison of the potential of two ferritins as anti-tick vaccines against *Haemaphysalis longicornis*. Parasit. Vectors 査読有 7 (1): 482 (2014)
- [学会発表](計 18 件)
1. 草木迫浩大, 正谷達膳, 屋田友里花, Melbourne Rio Talactac, Emmanuel Pacia Hernandez, 前田大輝, 望月雅美, 田仲哲也, 汎用的な細胞凍結保存液を用いた *Babesia gibsoni* 原虫凍結保存法の検討およびその改良, 第 85 回日本寄生虫学会大会, 2016 年 3 月, (宮崎)
 2. 田仲哲也, 病原微生物感染に關与するマダニ生物活性分子について, 日本衛生動物学会・日本ダニ学会共催 公開シンポジウム(招待講演), 2015 年 9 月, (東京)
 3. Melbourne Rio Talactac, 好井健太朗, 辻尚利, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, 望月雅美, Virucidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against tick-borne encephalitis virus surrogate Langat virus, 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015 年 9 月, (青森)
 4. Tetsuya Tanaka, Remil Linggatong Galay, Rie Takechi, Rika Umemiya-Shirafuji, Melbourne Rio Talactac, Hiroki Maeda, Kodai Kusakisako, Masami, Mochizuki, Kozo Fujisaki, Knockdown of ferritin genes increases the susceptibility of the hard tick *Haemaphysalis longicornis* to bacterial infection, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology Congress 2015 (国際学会), 2015 年 8 月, (イギリス)
 5. 田仲哲也, 栗巢孔士, 前田大輝, 宮田健, 草木迫浩大, Remil Linggatong Galay, Melbourne Rio Talactac, 望月雅美, 藤崎幸蔵, フタトゲチマダニ由来ロイシンリッチリピート保有タンパク質(HILRR)の発現動態とバベシア原虫に及ぼす影響, 第 23 回 SADI, 2015 年 6 月, (宮城)
 6. Remil Linggatong Galay, 武智理恵, 白藤(梅宮)梨可, Melbourne Rio Talactac, 前田大輝, 草木迫浩大, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, Decreased resistance of *Haemaphysalis longicornis* ticks to bacterial challenge after knockdown of ferritin molecules, 第 23 回 SADI, 2015 年 6 月, (宮城)

7. 草木迫浩大, 正谷達膳, 宮田 健, Remil Linggatong Galay, 前田大輝, 辻 尚利, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニ由来 2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (HIPrx2) の抗酸化部位の検索, 第 84 回日本寄生虫学会大会, 2015 年 3 月, (東京)
 8. Remil Linggatong Galay, Rie Takechi, Rika Umemiya-Shirafuji, Melbourne Rio Talactac, Hiroki Maeda, Kodai Kusakisako, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, The role of ferritin in immunity of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis* injected with *Escherichia coli*, 第 84 回日本寄生虫学会大会, 2015 年 3 月, (東京)
 9. Kodai Kusakisako, Tatsunori Masatani, Takeshi Miyata, Remil Linggatong Galay, Hiroki Maeda, Naotoshi Tsuji, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, Identification of the antioxidant active sites of *Haemaphysalis longicornis* 2-Cys type peroxidoredoxin (HIPrx2), 2015 年 2 月 (台湾)
 10. Hiroki Maeda, Takeshi Miyata, Kodai Kusakisako, Remil Linggatong Galay, Rika Umemiya-Shirafuji, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, Identification and characterization of a C-type lectin like protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, The 2nd Sapporo Summer Seminar for One Health, 2014 年 9 月 (北海道)
 11. 武智理恵, Galay Remil Linggatong, 前田大輝, 草木迫浩大, 松尾智英, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニ由来 TNF Receptor Associated Factor (TRAF) の同定とその役割について, 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014 年 9 月 (北海道)
 12. 草木迫浩大, 正谷達膳, Galay Remil Linggatong, 前田大輝, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニ由来 2-Cys 型ペルオキシレドキシシンの機能解析, 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014 年 9 月 (北海道)
 13. Galay Remil Linggatong, 白藤(梅宮)梨可, 宮田健, 草木迫浩大, 前田大輝, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, The critical functions of ferritins in *Haemaphysalis longicornis* and their potential as target molecules for tick control, 第 157 回日本獣医学会学術集会, 2014 年 9 月 (北海道)
 14. 草木迫浩大, 正谷達膳, Remil Linggatong Galay, 前田大輝, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニ由来 2-Cys 型ペルオキシレドキシシンの動態, 第 22 回分子寄生虫学ワークショップ 第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2014 年 8 月 (北海道)
 15. 前田大輝, 宮田健, 草木迫浩大, Remil Linggatong Galay, 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 C 型レクチン様蛋白質の動態および機能解析, 第 22 回分子寄生虫学ワークショップ 第 12 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2014 年 8 月 (北海道)
 16. Remil Linggatong Galay, Takeshi Miyata, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroki Maeda, Kodai Kusakisako, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, The potential of recombinant ferritin 1 and ferritin 2 as anti-tick vaccine against *Haemaphysalis longicornis*, TTP8: Ticks and Tick-Borne Pathogens, 2014 年 8 月 (南アフリカ)
 17. Galay Remil Linggatong, Umemiya-Shirafuji Rika, Maeda Hiroki, Kusakisako Kodai, Mochizuki Masami, Fujisaki Kozo, Tanaka Tetsuya, The iron-storage and antioxidant functions of two types of ferritin are critical to successful blood feeding and reproduction of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, The XIIIth International Congress of Parasitology, 2014 年 8 月, (メキシコ)
 18. Kozo Fujisaki, Naotoshi Tsuji, Xuenan Xuan, Rika Shirafuji-Umemiya, Damdinsuren Boldbaatar, Tetsuya Tanaka, Takeshi Hatta, Banzragch Battur, Badgar Battsetseg, Ticks survive at a threshold between engorgement and starvation, 14th International Congress of Acarology (招待講演), 2014 年 7 月 (東京)
- [図書](計 4 件)
1. Galay, R. L., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K. and Tanaka, T. "RNA Interference: A Powerful Functional Analysis Tool for Studying Tick Biology Towards Tick and Pathogen Control" in RNA Interference (Editors: Ibrokhim Y. Abdurakhmonov) pp. 411-445. InTech-Open Access Publisher. Croatia. (2016)
 2. Galay, R. L., Miyata, T., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K. and Tanaka, T. "Host immunization with recombinant proteins to screen antigens for tick control" in Vaccine Design: Methods and Protocols (Editors: Sunil Thomas) pp. 261-273. Springer. New York. (2016)
 3. 田仲哲也, 池田輝雄, 岡本まり子, 松本

- 安喜(編集:池田輝雄、小川健司、松本安喜)第2章 免疫の概念(獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠 獣医免疫学)(株)緑書房 pp. 32-47(2015)
4. 田中哲也(編集:堀井洋一郎、野中成晃、加藤大智、平 恵介、松本 淳、横山直明)第6章 節足動物各論Ⅰ(ダニ)(獣医学教育モデル・コア・カリキュラム準拠 寄生虫病学)(株)緑書房 pp. 172-176(2014)

[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/sinkoukansen/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中哲也(TANAKA TETSUYA)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・
准教授

研究者番号: 00322842

(2)連携研究者

望月雅美(MOCHIZUKI MASAMI)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・
教授

研究者番号: 90157834