

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850190

研究課題名(和文)パベシア原虫のマダニ中腸内ステージシフトに関わる遺伝子の探索的研究

研究課題名(英文)Studies on Babesia transcriptome associated with the transition of asexual form developing in the host into tick vector stage

研究代表者

八田 岳士(Hatta, Takeshi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00455304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、畜産経済に甚大な被害を及ぼすマダニ媒介感染症の一つであるパベシア症について、特にマダニベクター内における存在様式に焦点を当て研究を行った。最新鋭のDNA配列解析装置である次世代シーケンサーを駆使し、マダニ体内に寄生する原虫の遺伝子情報を読み取り、その発現を分子レベルで可視化することに成功した。本解析では、マダニベクターステージにおける原虫の代謝が宿主ステージとは異なる可能性を見出し、特に糖代謝機能の変化が、原虫のベクターへの適応、すなわち宿主からベクターへステージシフトするためのトリガーである可能性を示唆する知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, babesiosis, one of the tick-borne infectious diseases, which causes serious damage to the livestock economy, was focused on, especially, to elucidate the mode of existence in the tick vector.

Massive DNA sequence information of Babesia protozoa parasitizing in ticks was obtained by utilizing the next generation sequencing machine and visualizing its expression at the molecular level with the use of specific antibody against babesial molecule. This analysis also revealed the possibility that the protozoan metabolism, especially sugar metabolism, in the vector stage was different from the host, suggesting that it may be one of the transition triggers from host to vector stage for the adaptation to the tick vector.

研究分野：分子寄生虫学

キーワード：パベシア マダニ ベクター 人工吸血法 トランスクリプトーム 経卵巣伝播

1. 研究開始当初の背景

(1) 防除戦略の転換が急がれているバベシア症制御対策

バベシア症は、畜産経済に巨額の被害(過去30年間毎年200億米ドル以上)をもたらすマダニ媒介感染症の原虫疾患である(Jongejan et al., 2004)。本疾病には、有効なワクチン予防法が確立しておらず、ジミナゼン製剤の製造中止により治療薬もない。また、殺ダニ剤依存のマダニ媒介感染症防圧法は、薬剤抵抗性マダニの頻出、残留薬剤による環境・食物連鎖の汚染などの問題と相まって、バベシア症制圧技術の開発が世界的に急務となっている。

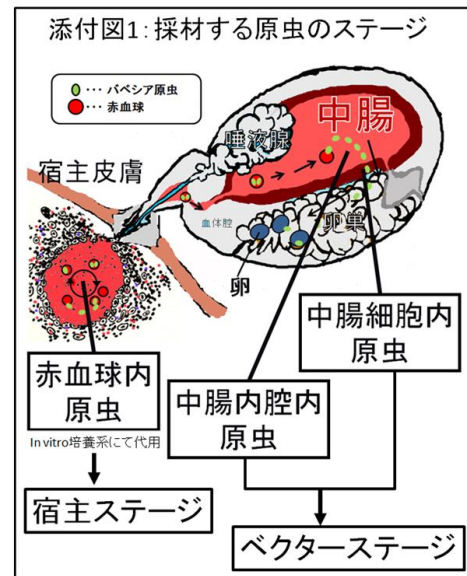
(2) バベシア症伝播阻止技術の開発に関する国内・国外の研究動向及び位置づけ
節足動物媒介感染症における伝播阻止ワクチン Transmission-blocking vaccine, TBVs とは、ベクターステージで病原体の増殖や生存を阻害することができるワクチンのことであり、病原体分子あるいはベクター分子をベースとして開発される(Coutinho-Abreu IV, Ramalho-Ortigao M. 2010)。前者には、マラリア原虫の蚊中腸ステージ・オーキネート表層蛋白質(Pvs25, Pvs28; Tsuboi T et al., 1998)があり、後者には、人獣共通感染症として重要なライム病(TROSPA, Pal et al., 2004)や家畜伝染病として重要なアナプラズマ病(P11, Liu et al., 2011)で注目されているマダニ分子について報告がある。しかし、バベシア症のTBVs 開発に関する研究においては、上記TROSPA などマダニ分子を候補とした研究がMerinoら(2013)によって報告されているが、バベシア原虫分子に関する研究は国の内外を問わずほぼ皆無である。

2. 研究の目的

バベシア原虫のベクター体内における増殖・分化・体内移行などのステージシフトに関連する遺伝子を探索し同定することを目的とした。
具体的には、バベシア原虫-マダニの組合せには、in vitro 培養系の確立している牛の大型ピロプラズマ原虫 *B. ovata* と、そのベクターであるフタトゲチマダニを用いる。研究を効率的に推進するため、まず *B. ovata* のゲノムを解析する。まず、宿主ステージにあたる赤内型原虫と、人工吸血により作出したバベシア原虫人工感染マダニの中腸ステージ(内腔内、および細胞内)の原虫について、それぞれトランスクリプトームを次世代シーケンスにより解析する。定量RT-PCRにより解析した主要な原虫遺伝子について、組換え蛋白質を作製し特異抗体を得る。これを用い、赤血球内およびマダニ中腸における原虫分子の発現をイメージングすることとした。

3. 研究の方法

本研究は、図1に示すそれぞれのステージにおけるバベシア原虫を解析対象として以下の手順で行った。



(1) *B. ovata* 原虫 Miyake 株のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンス (NGS) による全ゲノム解析を行い、ドラフトゲノム配列について、近縁種原虫のゲノム情報をベースとした遺伝子予測解析および BlastX 解析によってアノテーションを付与した。

(2) 赤内型 *B. ovata* 原虫(宿主ステージ)の total RNA を抽出し、NGS による mRNA-seq 解析(トランスクリプトーム解析)を行った。得られたリードは、ドラフトゲノム配列にマッピングし、発現遺伝子について同定した。

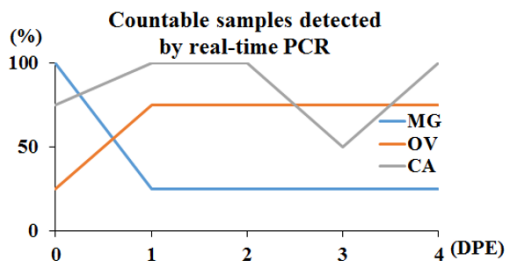
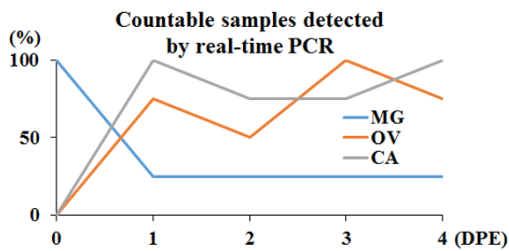
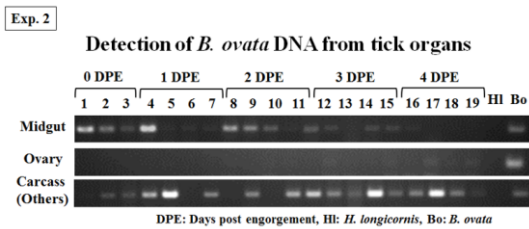
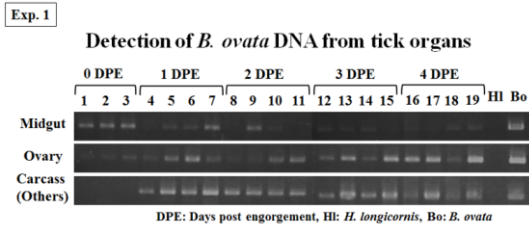
(3) 吸血終了後、経日的に原虫人工感染フタトゲチマダニより中腸を採材し、内腔内容物と組織に分け、両者より total RNA を抽出し、NGS による mRNA-seq 解析(トランスクリプトーム解析)を行った。得られたリードは、ドラフトゲノム配列にマッピングし、発現遺伝子について同定した。

(4) マッピングによる発現比較により、マダニステージで発現量が変動する原虫遺伝子に着目し、その組換え蛋白質を作製しマウスにて特異抗体を作る。これを用い、間接免疫蛍光抗体法などによって、上記中腸内の *B. ovata* 原虫における動態をイメージングした。

4. 研究成果

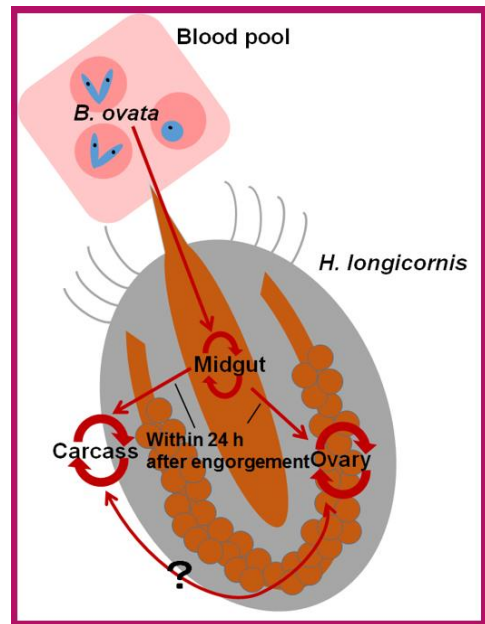
本研究では、マダニ媒介感染症の一つであるバベシア症において、ベクターステージで病原体の増殖や生存を阻害することが可能な伝播阻止ワクチンの開発を目指し、バベシア病原虫のベクターステージにおける増殖・分化・体内移行などのステージシフトにおいて重要な分子を解明することを目的とし当該補助金による支援のもと行っている。平成26年度は、牛バベシア病原虫 *Babesia ovata* のゲノムを解析し、バイオインフォマティクス解析によって原虫遺伝子の予測お

よびアノテーションの付与を行った。さらに赤血球内発育ステージにおける *Babesia* 原虫のトランスクリプトームを解析し、原虫の先端部小器官であるロプトリーに局在するとされる RAP1 等の複数の遺伝子が発現していることが判った。平成 27 年度は、人工吸血実験系によるバベシアーマダニベクターモ



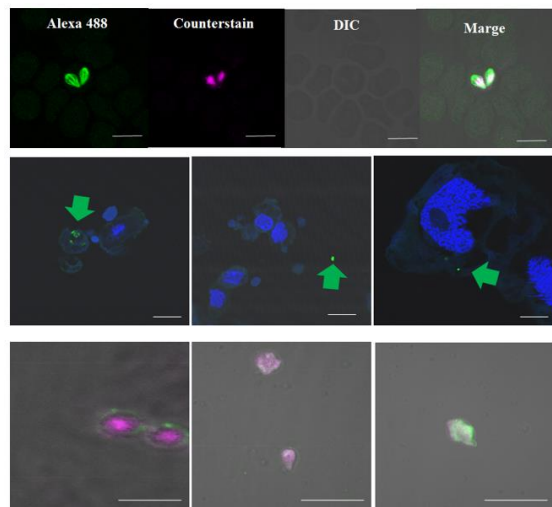
デル実験系を用い、原虫がマダニ中腸を通過するに至る時間軸について着目しその動態について解析した。これによるとマダニ中腸内に取り込まれた原虫は、24 時間以内であれば中腸壁を通過することが可能であり、一部の腸細胞内に残存して生きながらえた原虫は非常に少ないものと示唆された。また、24 時間以降では、中腸臓器はその他の卵巣等の臓器と異なり、原虫の分裂増殖の主要な場ではないことも示唆された（上図および右挿入図参照）。

上記時間軸をベースとした人工感染実験系をもとに、バベシア原虫のマダニ中腸ステージにおけるトランスクリプトーム解析を行った。平成 26 年度解析を終えた赤血球寄生ステージでの発現遺伝子リストとの比較 differentially expressed genes 解析により、原虫の糖代謝に関連する遺伝子の発現増強が確認できた。最終年度は、原虫がマダニ中



腸を通過するに至る時間軸の中でも、特に赤血球ステージからマダニベクター中腸ステージへと形態的にも生理生化学的にもシフトチェンジが起こる吸血終了後 3 日目のサンプルを主軸として、DEG の詳細な解析を行った。これによると、原虫の糖代謝、特に五炭糖の取り込みに関係するヘキソーストランスporter様 (Ht) 遺伝子と糖のリン酸化に関与するヘキソキナーゼ様遺伝子の発現増強を確認した。研究期間を通じ、バベシア原虫のベクターステージにおける糖代謝関連遺伝子、特に Ht やヘキソキナーゼ機能の重要性が高いことが示唆され、糖代謝シフトチェンジが宿主からベクターへのトランジショントリガーである可能性を提唱するに至った。

下図上段は、赤血球内の原虫を緑色で可視化した。中央と下段は、マダニ体内の原虫をマダニ体内で発現する原虫分子に対する特異抗体を用いて可視化したものである。



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 2 件)

① Maeda H, Hatta T et al., Initial development of *Babesia ovata* in the tick midgut. *Vet Parasitol.* 2017 Jan 15;233:39-42. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.11.020. Epub 2016 Nov 29. (査読有)

② Maeda H, Hatta T et al., Establishment of a novel tick-*Babesia* experimental infection model. *Sci Rep.* 2016 Nov 14;6:37039. doi: 10.1038/srep37039. (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

① 前田大輝、八田岳士ら、「*Babesia ovata* 原虫におけるマダニ中腸形態へのステージシフト誘導実験」第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6～8 日、日本大学湘南キャンパス (神奈川県藤沢市)

② 前田大輝、八田岳士ら、「マダニの自然免疫とバベシアとともに…」第 24 回分子寄生虫学ワークショップ・第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、2016 年 8 月 21～24 日、帯広畜産大学原虫病研究センター (北海道帯広市)

③ 八田岳士 (招待講演)、「マダニベクター研究のカッティング・エッジ」第 24 回病害動物の生理分子生物談話会・第 68 回日本衛生動物学会大会、2016 年 4 月 15～17 日、栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市)

④ 前田大輝、八田岳士ら、「フタトゲチマダニ体内における *Babesia ovata* 移行動態について」第 85 回日本寄生虫学会大会、2016 年 3 月 19～20 日、宮崎市民プラザ (宮崎県宮崎市)

⑤ Hatta T. (Invited Speaker), An advanced method for the study of the biological characteristics of the tick, *Haemaphysalis longicornis*, carrying tick-borne pathogens. The 2nd Tokyo Vector Encounter., Mar 2nd 2016, The Jikei University School of Medicine (東京都港区)

⑥ 前田大輝、八田岳士ら、「ベクターマダニ体内における *Babesia ovata* 増殖動態についての一考察」第 158 回日本獣医学会学術集会、2015 年 9 月 7～9 日、北里大学十和田キャンパス (青森県十和田市)

⑦ Hatta et al., Cloning of octopamine receptor-like genes from some Kenyan field collections of an acaricide resistant tick, *Rhipicephalus decoloratus*. 第 84 回日本寄生虫学会大会、2015 年 3 月 21～22 日、杏林大学三鷹キャンパス (三鷹市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八田 岳士 (HATTA, Takeshi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00455304