

## フィラリア線虫と媒介節足動物の相互関係の解明

研究協力者 動物衛生研究所 辻 尚利

### 研究要旨

病原体を伝播する吸血性節足動物（ベクター）が保有する生物活性分子の機能探索から以下の成果を得た。1）吸血行動の中心器官である中腸には、宿主血液を効率よく消化するヘモグロビン分解経路が存在し、蛋白分解酵素とその阻害剤の連携・協調作用によって制御されていることが分かった。特に、システインプロテアーゼ機能を発揮するマダニ中腸カテプシン（HICPL-A）をノックダウンしたマダニでは有意な致死率が認められたことから、HICPL-A は吸血行動を支えるヘモグロビン分解経路の中心的役割を果たしていることが示唆された。2）マダニの自然免疫機構を担うヘモサイトにおいて発現するキモトリプシンインヒビター様分子（HICHI）は、ノックダウンによって吸血行動に関与する多くの特質が抑制されたことから、マダニの恒常性維持に HICHI が不可欠であることが示された。さらに、今回、我々が独自に開発したマダニの人工吸血系が、動物を使って吸血させる *in vivo* モデルと比較して、マダニ吸血時の表現型だけでなく、吸血関連遺伝子の変動も同等であったことから、ベクターモデルとして活用できることが確認された。

### A. 研究目的

フィラリア線虫などの内部寄生虫（宿主体内への寄生）とマダニなどの疾病媒介節足動物（ベクター）は宿主の生体防御反応を巧みに回避して寄生を可能としているが、その生残戦略はほとんど分かっていない。本研究では、寄生虫が独自に確立したこうした戦略を支える遺伝子産物の機能解明を実施し、これによって、線虫及びベクターの生存・繁殖・侵入・存続に欠かせない分子機構を標的とするワクチンや化合物創出の分子基盤を明らかにし、寄生虫感染症及び節足動物媒介性疾病防除技術の方策を見出すことを目的とする。

### B. 研究方法

ライム病やバベシア症を媒介する吸血性節足動物のフタトゲチマダニ（*Haemaphysalis longicornis*）が産生する生物活性分子（TBM）の機能解析を生化学、細胞生物学的及び逆遺伝学的技法を用いて実施した。

（1）マダニ中腸カテプシン（HICPL-A）とヘモグロビン分解経路を構成する蛋白分解酵素とその阻害剤との相互関係の解析

HICPL ノックダウンマダニ（HICPL-A k/d）におけるヘモグロビン分解経路参画分子の蛋白分解酵素と阻害剤の発現動態を定量 PCR 及び免疫蛍光抗体法を用いて解析した。

（2）ヘモサイトで発現するキモトリプシンインヒビター様分子（HICHI）ノックダウンマダニ（HICHI k/d）における吸血時の表現型の解析

マダニの血体腔に HICHI の dsRNA を注入後、ウサギ耳袋法で付着させ、吸血行動の変化を無処置マダニと比較した。

（3）マダニ人工吸血系における吸血関連遺伝子の動態解析

*H. longicornis* の人工吸血系におけるマダニ中腸上皮細胞で宿主血液を分解するヘモグロビン分解経路参画分子の動態を *in vivo* 吸血系と比較した。

### C. 結果

（1）HICPL-A ノックダウンマダニ（HICPL-A k/d）の表現型

HICPL-A k/d では顕著な吸血阻害が確認され、約 60% のマダニ個体が死滅した。生残した個体では吸血期間の延長や飽血時体重の減少が認められた。中腸の組織学的解析から、内腔にはエオジン好性の硝子様小体が観察され、上皮細胞の機能不全が示唆された。HICPL-A k/d の飽血体重（ $333.9 \pm 10.5 \text{mg}$ ）は対照群（ $353.3 \pm 4.3 \text{mg}$ ）と比較して、吸血不全に起因して有意な減少を認めた。さらに、HICPL-A はヘモグロビン分解経路を構成する蛋白分解酵素とその阻害剤を制御することが分かった。酵素群（HICPL-B、

*HISCP1*, *HILgm-1*, *HILgm-2*, *longepsin*, *longipain*) と阻害剤群(*Hlcyst-1*, and *Hlcyst-2*)の発現は無処置と比較して、大きな変動が確認された。吸血開始後 24 時間では *longepsin*, *HISCP-1*, *Hlcyst-1* 及び *Hlcyst-2* の発現は減少したが、*longipain*, *HICPL-B*, *HILgm-1* 及び *HILgm-2* は増加した。*HISCP1* 発現の減少は飽血時まで持続し、*HILgm-1* 及び *HILgm-2* は吸血後 72-96 時間に増加した。

#### (2) HICHI k/d の表現型

HICHI の RNA が発現抑制されたマダニでは、ヘモサイトにおける内在性 HICHI の消失が確認された。吸血行動に関連する特質では、まず生存数の減少が確認された。顕著な飽血期間の延長 (HICHI:  $6.8 \pm 0.4$  days, 無処置:  $5.2 \pm 0.5$  days) と飽血時体重 ( $138.6 \pm 52.9$  mg,  $310.3 \pm 44.9$  mg) の減少がそれぞれ認められた。産卵前期間 ( $4.97 \pm 0.7$ ,  $5.18 \pm 0.7$  days) に有意な差は認められなかったが、産卵総重量 ( $77.34 \pm 26.9$  mg,  $189.21 \pm 38.7$  mg)、産卵数 ( $1152.48 \pm 401.7$ ,  $2865.4 \pm 499.4$ ) 及び孵化率 ( $50.08 \pm 6.8$ ,  $61.64 \pm 4.1$ ) は有意に減少した。

(3) 確立したマダニ人工吸血系と *in vivo* 吸血系におけるヘモグロビン分解経路参画分子の発現動態の比較

$\beta$ -actin を用いた RNA 発現量の標準化を行ったが、参画分子 (*HISP*, *Longepsin*, *Longipain*, *HISCP1*, *HILgm*, *HILgm2*, *HILAP* *HILAP2*) の発現に有意な差は確認されなかった。また、中腸の恒常性維持に必要な *Hlgut-defensin* も同量発現であったことから、人工吸血系は *in vivo* 吸血系を再現していることが示された。

#### D. 考察

HICPL-A 及び HICHI は吸血行動の維持に関与していることが示唆された。また、HICPL-A はマダニヘモグロビン分解経路の構成要素である酵素群、阻害剤群と協調して発現、機能していると考えられた。このような蛋白分解酵素及びその阻害剤は、他の媒介節足動物や住血性寄生線虫類も保持していることが想定され、媒介昆虫を含めたベクター制御に貢献できると同時に、ベクター由来の新規抗寄生虫薬の標的としても有効であると考えられた。さらに、我々が確立したマダニ人工吸血系は、宿主からの吸血行動における生理反応をほぼ再現できており、ベクターによる吸血・病原体媒介のモデルとして活用可能であると考えられた。

#### E. 結論

本成果は、マダニをはじめとした外部寄生性節足動物の生存戦略の根幹である付着および吸血に関与する分子を標的とした新規寄生虫防圧法の開発に有効な知見であると考えられた。また、カテプシンなどは寄生線虫や他の媒介性節足動物の寄生戦略にも関与することが考えられ、これら分子を標的とする新規の抗寄生虫薬、抗マダニ薬及び外部寄生虫薬の開発が期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 英文論文

Alim MA, Islam MK, Anisuzzaman, Miyoshi T, Hatta T, Yamaji K, Fujisaki K, Tsuji N. A hemocyte-derived Kunitz-BPTI-type chymotrypsin inhibitor, HICHI, from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, plays regulatory functions in tick blood-feeding processes. *Insect Biochem Mol Biol.* 42, 925-34. 2012.

Hatta T, Miyoshi T, Matsubayashi M, Islam MK, Alim MA, Anisuzzaman A, Yamaji K, Fujisaki K, Tsuji N. Semi-artificial mouse skin membrane feeding technique for adult tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Parasit Vectors.* 15, 263. 2012.

##### 2. 学会発表

Anisuzzaman, Alim Abdul, Islam Khyrul, Takeharu Miyoshi, Takeshi Hatta, Makoto Matsubayashi, Kozo Fujisaki, Naotohi Tsuji. Longistatin, a plasminogen activator from the tick *Haemaphysalis longicornis*, binds with RAGE and induces protective immunity. 154th Meeting of the Japanese Society of Veterinary Science. 岩手大学、盛岡、平成24年9月14~16日

八田岳士、三好猛晴、松林 誠、アニスザマン、アリム アブドール、山地佳代子、五十嵐郁男、藤崎幸蔵、辻 尚利. 人工吸血系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、群馬大学、前橋、平成 24 年 10 月 12~13 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし