

受理年月日	受理番号
25. 3. 12	1

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 25 年 3 月 6 日

新規	※新規か継続か、該当する方を記載		
研究分野	生体防御学分野	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄 学南、西川義文
研究課題名	フタトゲチマダニから得られたフェリチンの特性解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	(た なか てつ や) 田 仲 哲 也	鹿児島大学 共同獣医学部・准教授	
研究分担者			
研究期間	平成 24 年 4 月 1 日 ～ 平成 25 年度 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>マダニにとって必須の生存基盤が宿主動物からの吸血・消化にあり、また疾病媒介の成否基盤が侵入病原体に対する血液消化産物に左右されることが考えられる。血液消化産物中に含まれるヘモグロビン由来のヘムからマダニ体内に様々な影響を及ぼす鉄が放出されることが予想される。そこで、申請者はマダニ体内で鉄代謝の重要な役割を担うフェリチン遺伝子に着目し、その特性について解析することを第 1 の研究目的とする。また、本共同研究では、フェリチンのバベシア原虫に及ぼす影響について調べ、フェリチンと媒介病原体のクロストークを明らかにすることも重要な研究目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>①我々はアジア・オセアニア地域で最も重要な疾病媒介であるフタトゲチマダニの臓器別の EST データベースの作成に着手し、これまでに唾液腺、中腸、ヘモリンフ、脂肪体、卵巣、発育胚について、合計 20,000 クラスターを超える完全長 cDNA ライブラリーからなる世界最大・最高水準のマダニの遺伝子ライブラリーの構築に成功した。これらの EST データベースを用いて、他の生物種のフェリチンと相同性の高い遺伝子配列の探索を行ったところ、フタトゲチマダニフェリチン(<i>Hlfer</i>)遺伝子の同定に成功した。</p> <p>②<i>Hlfer</i> の特性を検証するために、<i>Hlfer</i> 遺伝子の発現を、発育段階別、臓器別、吸血日数別にそれぞれ RT-PCR やウエスタンブロッティングによって解析した。また、RNA 干渉法による <i>Hlfer</i> 遺伝子発現の抑制を行い、マダニの吸血時間、体重変化、生存率、産卵、孵化などの変化を観察し、マダニの吸血・繁殖生理における <i>Hlfer</i> 遺伝子の機能と役割について検討した。</p> <p>③さらに、本共同研究では、大腸菌を用いて発現した組換えフェリチンをバベシア原虫の培養系に添加し、バベシア原虫の増殖率の変化について調べ、フェリチンとバベシア原虫の相互関係を検証した。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>RT-PCR とウエスタンブロット解析の結果から、マダニの各臓器とステージ別において、フェリチン遺伝子とフェリチンタンパク質の発現レベルがそれぞれ異なっていた。興味深いことに、フェリチン2遺伝子の発現レベルが微弱にもかかわらず、産卵中の卵巣や卵にフェリチン2タンパク質の存在がウエスタンブロット法や間接蛍光抗体法で確認された。RNA 干渉法によってフェリチン遺伝子をノックダウンしたマダニでは、吸血時の体重や産卵数が顕著に低下し、ノックダウンを行った群では飽血に至らず死亡した個体も観察された。また、フェリチン遺伝子をノックダウンしたマダニの中腸を組織レベルで観察したところ、中腸上皮細胞の微絨毛や細胞内顆粒の異常が認められた。以上の結果から、フタトゲチマダニの吸血や産卵において、フェリチンは鉄分子の供給や鉄分子の毒性に対して、重要な制御的役割を果たす必須な分子であることが考えられた(J. Exp. Biol., In press)。</p> <p>しかしながら、組換えフェリチンをバベシア培養系に添加し、バベシア原虫の増殖率の変化について調べたところ、虫体の増殖率に有意な差は認められなかった。今後は、マダニ体内でのバベシア原虫とフェリチンの因果関係について検討を進める予定である。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>(学会発表)</p> <p>Remil Linggatong Galay, Kyaw Min Aung, Rika Umemiya-Shirafuji, Tetsuya Tanaka, Kozo Fujisaki, Characterization of two ferritin genes from <i>Haemaphysalis longicornis</i>, in particular, their role in blood feeding and reproduction, 第81回日本寄生虫学会大会, 2012年3月(兵庫).</p> <p>Tetsuya Tanaka, Remil Linggatong Galay, Hiroyuki Mori, Kyaw Min Aung, Hiroki Maeda, Rika Umemiya-Shirafuji, Xuean Xuen, Hiroshi Suzuki, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Characterization and movement of iron binding proteins on <i>Haemaphysalis longicornis</i>, XXIV International Congress of Entomology, 2012年8月(韓国).</p> <p>Remil Linggatong Galay, Kyaw Min Aung, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroki Maeda, Hiroshi Suzuki, Xuean Xuan, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, Characterization of two ferritin from <i>Haemaphysalis longicornis</i>, in particular their role in blood feeding and reproduction, Chula International Workshop PEP2012, 2012年10月(タイ).</p> <p>Remil Linggatong Galay, Kyaw Min Aung, 白藤(梅宮)梨可, 前田大輝, 松尾智英, 川口博明, 三好宣彰, 鈴木宏志, 玄学南, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニの吸血および産卵におけるフェリチンの重要性, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月(福岡).</p> <p>(論文)</p> <p>Galay, R. L., Aung, K. M., Umemiya-Shirafuji, R., Maeda, H., Matsuo, T., Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Suzuki, H., Xuan, X., Mochizuki, M., Fujisaki, K. and Tanaka, T., Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick <i>Haemaphysalis longicornis</i>, J. Exp. Biol. (In press), (2013).</p>