

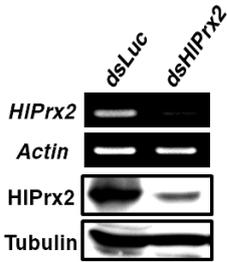
受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 28 年 6 月 20 日

採択番号	27-共同-11		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤梨可
研究課題名	マダニの吸血や産卵におけるペルオキシレドキシンの役割について		
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・准教授	
研究分担者	(くさきさこ こうだい) 草木 迫 浩 大	山口大学 大学院連合獣医学研究科・3年	
	(しら ふじり か) 白 藤 梨 可	帯広畜産大学 原虫病研究センター・助教	
研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>活性酸素の一つである過酸化水素は、生体に対して酸化ストレスを引き起こす。マダニは偏性吸血性節足動物で、最小単位の遊離鉄を含む脊椎動物血液のみを摂取するため、体内ではこの遊離鉄と酸素の反応により過酸化水素が産生され、マダニは吸血により大量の過酸化水素にさらされることが予想される。マダニにおいて過酸化水素の制御が重要と考え、過酸化水素消去分子であるペルオキシレドキシに着目した。そこで我々は、RNA 干渉法を用いて、<i>H1Prx2</i> 遺伝子ノックダウンマダニを作出し、<i>H1Prx2</i> がマダニの吸血に対する酸化ストレス応答や雌成ダニの繁殖へ及ぼす影響について解析を行った。</p>		
研究経過の概要	<p>【背景】 我々は、マダニ体内で、酸化ストレスを惹起する過酸化水素を制御することが予想される <i>H1Prx2</i> の機能を大腸菌で発現させた組換え体を用いて検証したところ、組換え <i>H1Prx2</i> が抗酸化活性を有することを明らかにした (Kusakisako et al., <i>Insect Mol. Bol.</i>, 2016)。また、マダニ個体での <i>H1Prx2</i> 遺伝子および蛋白質の発現動態解析を行ったところ、mRNA レベルでは吸血により <i>H1Prx2</i> 遺伝子の発現が上昇し、蛋白質レベルでは恒常的な <i>H1Prx2</i> の発現が認められた。さらに、成ダニの臓器別(唾液腺、中腸、卵巣、脂肪体)の発現動態解析では、卵巣での <i>H1Prx2</i> 遺伝子と蛋白質の発現が顕著であることが明らかとなった。以上の結果から、<i>H1Prx2</i> がマダニの吸血に対する酸化ストレス応答に関与し、卵巣の発育や胚形成といった成ダニの繁殖に重要な役割を果たす可能性が考えられた。このような背景を基に、RNA 干渉法による <i>H1Prx2</i> 遺伝子ノックダウンマダニを作出し、ウサギで吸血させることで、<i>H1Prx2</i> がマダニの吸血に対する酸化ストレス応答や吸血後の雌成ダニの繁殖へ及ぼす影響について検証した。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>【実験結果】 二本鎖 RNA を用いた RNA 干渉法により、雌成ダニの <i>HIPrx2</i> 遺伝子ノックダウン(<i>dsHIPrx2</i>)を行ったところ、遺伝子および蛋白質レベルでコントロール群(<i>dsLuc</i>)と比較して顕著な発現抑制が確認された(図 1)。次に、</p> <p>図1. RNA干渉法による<i>HIPrx2</i> 遺伝子ノックダウン効果</p>  <p>作出した <i>HIPrx2</i> 遺伝子ノックダウンマダニを用いて、ウサギで吸血させたところ、雌成ダニの飽血後の体重、産下された卵の総重量、卵からの幼ダニへの孵化率が有意に減少した(表 1)。</p> <p>表1. <i>HIPrx2</i>遺伝子ノックダウンによるマダニの吸血・繁殖に及ぼす影響</p> <table border="1" data-bbox="683 562 1465 719"> <thead> <tr> <th>ノックダウン群</th> <th>飽血体重 (mg)</th> <th>総卵重量 (mg)</th> <th>孵化率 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><i>dsLuc</i></td> <td>263.7±58.9</td> <td>162.1±38.9</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td><i>dsHIPrx2</i></td> <td>204.4±56.3*</td> <td>116.7±45.3*</td> <td>77**</td> </tr> </tbody> </table> <p>*$P < 0.01$ (Welch's <i>t</i>-test); **$P < 0.05$ (χ^2乗検定)</p> <p>【考察】 <i>HIPrx2</i> 遺伝子ノックダウンによりマダニの飽血体重が有意に減少したことから、<i>HIPrx2</i> はマダニ体内で吸血時における中腸での酸化ストレス応答に関与することが示唆された。また、<i>HIPrx2</i> 遺伝子ノックダウンにより総卵重量および孵化率が有意に減少したことから、吸血後の卵巣における卵形成および産下された卵における胚形成に関与することが推察された。以上の結果から、<i>HIPrx2</i> は抗酸化活性を持ち、マダニの吸血と成ダニにおける卵形成並びに産下された卵での胚形成に関与する分子であることが考えられた。</p>	ノックダウン群	飽血体重 (mg)	総卵重量 (mg)	孵化率 (%)	<i>dsLuc</i>	263.7±58.9	162.1±38.9	100	<i>dsHIPrx2</i>	204.4±56.3*	116.7±45.3*	77**
ノックダウン群	飽血体重 (mg)	総卵重量 (mg)	孵化率 (%)										
<i>dsLuc</i>	263.7±58.9	162.1±38.9	100										
<i>dsHIPrx2</i>	204.4±56.3*	116.7±45.3*	77**										
<p>研究成果の発表</p>	<p>【学会発表】</p> <p>草木迫浩太, Remil Linggatong Galay, 白藤(梅宮)梨可, 前田大輝, Melbourne Rio Talactac, 辻 尚利, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, マダニ吸血におけるペルオキシレドキシンの役割について, 第 23 回 SADI, 2015 年 6 月 (宮城).</p> <p>草木迫浩太, Remil Linggatong Galay, 白藤(梅宮)梨可, 前田大輝, Melbourne Rio Talactac, 辻 尚利, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, フタトゲチマダニにおけるペルオキシレドキシンの役割について, 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015 年 9 月 (青森).</p> <p>Kodai Kusakisako, Tatsunori Masatani, Takeshi Miyata, Remil Linggatong Galay, Rika Umemiya-Shirafuji, Hiroki Maeda, Melbourne Rio Talactac, Naotoshi Tsuji, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, Tetsuya Tanaka, 2-Cys Peroxiredoxin is needed in blood feeding and next-generation production of ticks, The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health, 2015 年 9 月 (北海道).</p> <p>田仲哲也, 草木迫浩太, 正谷達膳, 宮田 健, Remil Linggatong Galay, 白藤(梅宮)梨可, 前田大輝, Melbourne Rio Talactac, 辻 尚利, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 過酸化水素消去酵素 2-Cys ペルオキシレドキシンはマダニの吸血および産卵時の抗酸化機構に関与する, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 (兵庫).</p>												