

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 30 年 5 月 22 日

採択番号	29 共同-1		
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	マダニから分離した <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の微生物学的特性解析		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	なかお りょう 中尾 亮	北海道大学大学院獣医学研究院・准教授	
研究分担者	めい じゅん っ May June Thu	北海道大学大学人獣共通感染症リサーチセンター・大学院生	
	かきさか けいた 柿阪 圭太	北海道大学獣医学部・学部学生	
	まつお かい 松尾 權	北海道大学獣医学部・学部学生	
	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 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>マダニは様々な微生物を保有し、その一部は共生体としてマダニに持続感染することでマダニの生理活動にとって重要な役割を持つことが知られつつある。研究代表者らは、国内外のマダニが保有する共生菌の分離を進めており、これまでに複数株のマダニに共生する <i>Spiroplasma</i> 属細菌の分離培養に成功している。ショウジョウバエ等に共生する <i>Spiroplasma</i> 属細菌では、子孫の性比決定や病原体（寄生性線虫、カビなど）に対する抵抗性に関与することが知られているが、マダニに共生する <i>Spiroplasma</i> 属細菌の役割は全く解析されていない。そこで、本共同研究では <i>Spiroplasma</i> 属共生菌がマダニの生理活動において何らかの役割を持つとの仮説を立て、実験室維持フタトゲチマダニを用いて <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の微生物学的特性を明らかにすることを計画した。</p>		
研究経過の概要	<p>北海道で採集されたシュルツェマダニ (<i>Ixodes persulcatus</i>) からマダニ細胞を用いて分離した <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を SP-4 無細胞培地で培養した。2 種類の共生菌接種群 (A 群: 6.3×10^6 菌体/匹接種、B 群: 6.3×10^8 菌体/匹接種) と滅菌水接種群および SP-4 培地接種群を 4 系統の実験群を準備し、フタトゲチマダニ (原虫研累代飼育株) 成ダニおよび若ダニへ、電動マイクロインジェクターを用いて接種した。接種後のマダニはウサギを用いた吸血に供し、成ダニについては飽血後体重、孵化率を算出し、若ダニでは脱皮率を観察した。さらに、卵および脱皮後の成ダニから DNA を抽出し、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌お</p>		

受理年月日	受理番号

	<p>よび、<i>Coxiella</i> 属共生菌の感染有無をリアルタイム PCR および PCR を用いて評価した。</p>
研究成果の概要	<p>◆ <i>Spiroplasma</i> 属共生菌のマダニへの実験的導入に初めて成功◆ <i>Ixodes</i> 属マダニから分離された <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を <i>Haemaphysalis</i> 属のフタトゲチマダニ成ダニおよび若ダニに接種した。その後、ウサギを用いたマダニ吸血試験を行い、成ダニ、卵、および孵化幼ダニを得た。Real-time PCR により検査したところ、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌がフタトゲチマダニにおいて介卵および経發育期伝播することを明らかにした。マダニにおいて、異種マダニの共生菌の人為的な導入に成功した例はこれまで報告されておらず、マダニと共生菌の関係を解析するために有用なモデルの作出に成功した。</p> <p>◆ <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の全ゲノムを解読◆ SP-4 培地で培養した菌体を材料に、ゲノム DNA を抽出し Illumina MiSeq を用いてゲノム解析を行なった。全長約 1.2 Mb の全ゲノム配列を取得し、アノテーションにより 1856 個の遺伝子コーディング領域、3 個の rRNA、32 個の tRNA を同定した。ANI 法による菌種同定の結果、米国で報告された <i>Spiroplasma mirum</i> と近縁であることを明らかにした。マダニ由来 <i>Spiroplasma</i> 属共生菌のゲノムとしては 2 例目の報告であり、今後比較ゲノム解析により、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌の進化および節足動物への適応過程の解明に有用な情報を得た。</p> <p>◆ <i>Coxiella</i> 属共生菌が産卵および孵化に重要であることを発見◆ SP-4 培地接種群で産卵重量の低下、幼ダニ孵化率の低下が観察された。孵化前後の卵において <i>Coxiella</i> 属共生菌の保有状況を検査したところ、滅菌水接種群では 100% の <i>Coxiella</i> 属共生菌保有率を示した。一方で、SP-4 培地接種群では、卵で 55-80% の <i>Coxiella</i> 属共生菌保有率を示し、孵化した幼ダニ（卵全体の約 10%）では 100% の保有率を示した。このことから、SP-4 培地に含まれる抗生物質により、<i>Coxiella</i> 属共生菌が死滅したことが推察される。一方で、本結果は、<i>Coxiella</i> 属共生菌が卵産生および幼ダニの孵化において重要な役割を持つことを意味している。これまで、マダニに共生する <i>Coxiella</i> 属共生菌の役割はビタミン B 類の生合成のみが知られていた。当該研究成果により、<i>Coxiella</i> 属共生菌のマダニに対する新たな役割が提示され、共生菌とマダニの関わりを理解する上で重要な知見を得た。</p>
研究成果の発表	<p>【学会発表】 柿阪圭太、<u>中尾 亮</u>、May June Thu、邱 永晋、杉本千尋、片倉 賢。 マダニから分離されたスピロプラズマの全ゲノム解析. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 2017 年 9 月 14 日. 鹿児島大学（鹿児島市）.</p>