

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24日

採択番号	29 共同-8		
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	Scale法を用いたマダニ組織の透明化技術の確立と過酸化水素の可視化		
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・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・4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29年4月1日 ~ 平成30年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニが長期間に渡って摂取する血液には、大量の遊離鉄が含まれる。鉄分子はフェントン反応から過酸化水素を経て、酸化力の高いヒドロキシラジカルを生じる。ヒドロキシラジカルは、生体高分子に酸化障害を引き起こす。このため、ヒドロキシラジカルの発生源となる鉄分子と過酸化水素の生成・消去の厳密な制御が必須となる。マダニ体内では、鉄分子の制御にフェリチンが、過酸化水素の制御にペルオキシレドキシシンが重要な役割を果たすことが明らかになっている。しかし、マダニ体内における過酸化水素の発生と動態については不明である。そこで、血色素等を排除した透明化マダニ組織を作製し、過酸化水素の発生並びに動態を可視化することを研究目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>【背景】 我々は、これまでに、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マダニ由来ペルオキシレドキシシン(H1Prx2)の機能を分子並びに個体レベルで明らかにした(Kusakisako et al., <i>Insect Mol. Biol.</i>, 2016; Kusakisako et al., <i>Parasit. Vectors</i>, 2016)。しかし、マダニ体内における過酸化水素の発生動態については明らかになっていない。そこで、マダニ体内での過酸化水素を可視化し、その発生動態・局在を明らかにすることを本研究の目的とした。哺乳類では、組織の透明化が盛んに行われ、蛍光分子を用いることで、生体内における蛍光分子の動態を直接観察することが可能となっている。そこで、組織透明化技術である Scale法によってマダニ組織の透明化を行うことで、蛍光プローブによる過酸化水素の特異的な検出が容易になることを予想した。本研究では、Scale法をマダニ組織へ応用し、マダニ体内の過酸化水素の発生動態を組織内で簡便に可視化する方法を検証した。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>【実験結果】 マダニ体内の過酸化水素(H₂O₂)の発生を観察するにあたり、H₂O₂を中腸内へ経肛門で直接接種し、H₂O₂発生の指標として <i>HIPrx2</i> の遺伝子発現について、リアルタイム PCR を用いて調べた。その結果、7%H₂O₂を接種した群において、接種後 15 並びに 30 分に <i>HIPrx2</i> 遺伝子の発現量が有意に増加した (図 1)。そこで、7%H₂O₂接種後 15 分の中腸並びに卵巣を用い、細胞内過酸化水素に特異的な蛍光プローブである BES-H₂O₂-Ac 並びに Scale 法を使用し、マダニ組織内における H₂O₂ の発生を観察した。その結果、中腸において、Milli-Q 接種群では過酸化水素の発生は確認されなかったが、7%H₂O₂接種群では H₂O₂ の発生が観察された (図 2, 中腸)。一方、卵巣において、Milli-Q 接種群でも H₂O₂ の存在が確認されたが、7%H₂O₂ の接種群で、卵母細胞における H₂O₂ の発生が顕著であった (図 2, 卵巣, 矢頭)。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="778 607 1098 981"> <p>図1. 過酸化水素接種による<i>HIPrx2</i>遺伝子発現に及ぼす影響</p> <table border="1"> <caption>Figure 1: HIPrx2 expression levels</caption> <thead> <tr> <th>接種後時間(分)</th> <th>Milli-Q</th> <th>7% H₂O₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>~0.15</td> <td>~0.15</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>~0.13</td> <td>~0.30</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>~0.08</td> <td>~0.15</td> </tr> </tbody> </table> <p>※P値はWelch's t検定により算出</p> </div> <div data-bbox="1129 607 1481 981"> <p>図2. 過酸化水素接種によるマダニ体内での過酸化水素発生の可視化</p> </div> </div> <p>【考察】 7% H₂O₂ を中腸内へ直接接種することで、マダニ体内において H₂O₂ の発生を誘導できた。また、マダニ組織に蛍光プローブ並びに Scale 法を使用することで、H₂O₂ 発生の観察が可能であった。さらに、Scale 法による透明化処理を行った場合でも、マダニ組織の形状を保った状態で観察が可能であった。以上の結果から、本法を応用することで、マダニ体内で、蛍光標識した病原体等の動態観察が可能となることが考えられた。</p>	接種後時間(分)	Milli-Q	7% H ₂ O ₂	0	~0.15	~0.15	15	~0.13	~0.30	30	~0.08	~0.15
接種後時間(分)	Milli-Q	7% H ₂ O ₂											
0	~0.15	~0.15											
15	~0.13	~0.30											
30	~0.08	~0.15											
<p>研究成果の発表</p>	<p>【学会発表】 <u>草木迫浩太</u>, Hernandez Emmanuel Pacia, Talactac Melbourne Rio, 好井健太郎, <u>田仲哲也</u>, ペルオキシレドキシンは連携して細胞内過酸化水素濃度を制御する, 第 86 回日本寄生虫学会大会, 2017 年 5 月(北海道).</p> <p><u>Kodai Kusakisako</u>, Remil Linggatong Galay, <u>Rika Umemiya-Shirafuji</u>, Emmanuel Pacia Hernandez, Hiroki Maeda, Melbourne Rio Talactac, Naotoshi Tsuji, Masami Mochizuki, Kozo Fujisaki, <u>Tetsuya Tanaka</u>, 2-Cys peroxiredoxin has an important role in blood feeding and reproduction through the regulation of hydrogen peroxide concentrations in the hard tick <i>Haemaphysalis longicornis</i>, The 9th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia, 2018 年 2 月(韓国).</p> <p>【論文発表】 <u>Kodai Kusakisako</u>, Emmanuel Pacia Hernandez, Melbourne Rio Talactac, Kentaro Yoshii, <u>Rika Umemiya-Shirafuji</u>, Kozo Fujisaki, <u>Tetsuya Tanaka</u>, Peroxiredoxins are important for the regulation of hydrogen peroxide concentrations in ticks and tick cell line, <i>Ticks Tick Borne Dis.</i> (2018), In press.</p>												