

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和 2 年 4 月 24 日

採択番号	2019-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	フタトゲチマダニの胚発生における抗酸化分子の発現プロファイルの作成		
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	へるなんですえまにゆえるぼっしや Hernandez Emmanuel Pacia	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	2019 年 4 月 1 日 ~ 2020 年 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、血液消化産物中に含まれるヘムの代謝過程で大量の鉄や過酸化物がマダニ体内に放出される。鉄や過酸化物から被る酸化ストレスへの応答は、吸血や産卵を左右する重要な機構である。マダニ生存基盤である吸血における酸化ストレス応答は卵にも影響し、その酸化ストレス応答には抗酸化分子が関与している可能性が考えられる。我々はその重要な機構を担う抗酸化分子として、フェリチンとグルタチオン S 転スフェラーゼに着目し、卵形成および胚発生における両者の遺伝子・タンパク質の発現を、胚発生のステージごとに検証した。また、酸化ストレス産物であるマロンジアルデヒドを測定することによって、胚発生における酸化ストレスを評価した。</p>		
研究経過の概要	<p>【背景】マダニは人獣共通感染症を含む様々な疾病を媒介する吸血性節足動物である。マダニによる感染症を制御するためには、その生体機能の解明が不可欠である。しかし、マダニ胚発生における胚の形態や抗酸化分子の発現動態は、いまだ不明な点が多い。我々は、抗酸化分子であるグルタチオン S 転スフェラーゼ(GST)とフェリチン(FER)に着目し、フタトゲチマダニの胚発生における両者の遺伝子・タンパク質の発現を、胚発生のステージごとに検証した。また、酸化ストレス産物であるマロンジアルデヒド(MDA)を測定することによって、胚発生における酸化ストレスを評価した。</p> <p>【材料と方法】卵は産卵から 5 日ごとにサンプリングを行い、それぞれを Day1、Day5、Day10、Day15、Day20 とした。各ステージの胚を、DAPI を用いて核染色をした後、蛍光顕微鏡で観察した。これらの卵からトータル RNA を抽出し、cDNA を合成した。続いて、リアルタイム PCR を実施し、GST と FER 遺伝子の発現量を定量した。また、ホモジナイズした卵からタンパク質を抽出した後、ウェスタンブロットティングにより、GST と FER タ</p>		

	<p>ンパク質の発現量を調べた。さらに、TBARS アッセイを実施して、卵の中に含まれるMDAの濃度を測定した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>【結果と考察】マダニ胚の各ステージについて、蛍光顕微鏡を用いて観察した結果、発生初期において卵黄周囲に胚細胞の増殖がみられ、発生の進行に伴って、脚の伸長、顎体部ならびに腹部の形成が観察された。</p> <p><i>GST</i> 遺伝子は Day1、次いで Day10 に多く発現していることが確認された。<i>GST</i> タンパク質の発現量は、Day1 から Day15 にかけて増加傾向を示した。また、TBARS アッセイの結果、胚発生の進行に伴い、MDA の増加が確認された。これらの結果から、胚は発生の過程において、持続的な酸化ストレスに曝露されており、<i>GST</i> 発現量の増加が、酸化ストレスの処理に関与していることが示唆された。</p> <p>一方、細胞内型である <i>FER1</i> ならびに分泌型である <i>FER2</i> 遺伝子は、Day1、Day5 において発現量が低く推移し、Day10 以降、発現量の増加が確認された。また、<i>FER1</i> タンパク質の発現は、全てのステージにおいて確認されなかった。この理由として、<i>FER1</i> の mRNA には iron-responsive element(IRE)と呼ばれる構造が存在しており、iron-regulatory protein(IRP)が鉄欠乏下において IRE に結合して、タンパク質の翻訳を制御していることが考えられた。従って、胚に含まれる鉄濃度は低濃度であることが推測された。対照的に、<i>FER2</i> 遺伝子の発現量が Day1、Day5 において非常に低いにも関わらず、<i>FER2</i> タンパク質は全てのステージで確認された。そのため、雌成ダニに存在する <i>FER2</i> タンパク質が、卵に移行していることが予想された。</p> <p>【結論】本研究では、フタゲチマダニの胚発生における胚の形態と、<i>GST</i> ならびに <i>FER</i> の発現動態について明らかにした。胚発生において、<i>GST</i> は、発現量の増加が確認され、酸化ストレスの処理に重要な役割を担うことが示唆された。<i>FER2</i> は、遺伝子の発現量が低いにも関わらず、タンパク質の発現が確認されたことから、胚発生における鉄輸送に寄与していることが予想された。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>【学会発表】 島崎 慧, <u>Emmanuel Pacia Hernandez</u>, 新原博子, 藤崎幸蔵, <u>田中哲也</u>, フタゲチマダニ胚発生における抗酸化分子の発現動態, 第27回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー, 上天草総合病院, 2019年5月(熊本)</p> <p>【論文発表】 <u>Emmanuel Pacia Hernandez</u>, Kei Shimazaki, Hiroko Niihara, <u>Rika Umemiya-Shirafuji</u>, Kozo Fujisaki, <u>Tetsuya Tanaka</u>, Expression analysis of glutathione S-transferases and ferritins during the embryogenesis of the tick <i>Haemaphysalis longicornis</i>. Heliyon 6 (3): e03644. (2020)</p>