

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022年6月3日

採択番号	2021-共同-15		
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	福本 晋也
研究課題名	雄ハマダラカ-マラリア原虫易感染モデルによるベクターコンピテンシー制御機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いかだい ひろみ 後井 宏実	北里大学獣医学部・准教授	
研究分担者			
	ふくもと しんや 福本晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021年4月1日 ~ 2022年3月31日		
目的・趣旨	<p>ハマダラカがマラリア原虫の感染を受けるオーカイネートからオーシスト形成期は原虫数が最も減少し、原虫感染に対して最も重要な防御免疫応答を起す時期である。</p> <p>様々な節足動物において、病原微生物に対する感受性雌雄差が報告されている。申請者はハマダラカにもマラリア原虫感受性の雌雄差があるとの仮説を立て、その立証を試みた。オーカイネートのマイクロインジェクションにより、本来吸血をしない雄に対しマラリア原虫を感染させることに成功した。次にオーシスト数を指標として雌雄ハマダラカのマラリア原虫感染表現型を解析した。その結果、雄ハマダラカが雌と比較し、高いマラリア原虫感受性を持つことを明らかにした。</p> <p>以上の結果を踏まえ、本研究では原虫感染時の雌雄ハマダラカ遺伝子シグナル応答を比較解析し、マラリア原虫の感受性を規定する因子を同定、そのメカニズムを解明することを目的とする。</p>		
研究経過の概要	<p>マイクロインジェクション感染モデルにより、雄ハマダラカが雌と比較し高い感受性を示すこと、オーシストの形成部位に組織特異性が無いことが明らかになった。次に、オーカイネートインジェクション後、24・72時間後の遺伝子発現を次世代シーケンサーによるRNA-Seq法を用いて比較解析した。その結果、雌雄双方においてインジェクション後24時間で最も有意な遺伝子転写変動が認められた。さらに雄ハマダラカに培養した <i>P. falciparum</i> のガメートサイトおよびザイゴートをインジェクションし、<i>P. falciparum</i> の発育を確認した。</p> <p>以上の結果を基盤として、ハマダラカのマラリア原虫ベクターコンピテンシー制御因子の同定を目指し、その分子メカニズムの解明を検討している。</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p><i>P. berghei</i> のオーカイネートのインジェクションによるオーシスト形成数は注入したオーカイネート数(2000-5000/蚊)に関わらず雄で雌よりも多く形成され、感染率はともに 100% で差はなかった。オーカイネートのインジェクションによって分化したスポロゾイトは、雌雄蚊どちらの由来かに関わらず、3-6 日でマウスへの感染が確認され、オーカイネートのインジェクション感染により形成されたスポロゾイトに感染性があることが示された。</p> <p>次に、雌雄 <i>A. stephensi</i> のオーシスト形成数に差を認めたため、原因遺伝子の探索を目的に RNA-seq を行った。まず雌雄蚊に 5000 オーカイネートまたは培養液のみをインジェクションし、オーカイネートが初期オーシストへと形態変化するインジェクション 24 時間後、およびオーシストへの形態変化が完了するインジェクション 72 時間後にそれぞれ蚊を採取して RNA-seq を行った。インジェクション 24 時間後において雄で遺伝子発現変動が 2 倍以上発現増加した遺伝子数は 140 個、発現減少したものは 89 個、雌では発現増加したものが 304 個、発現減少したものが 167 個であった。インジェクション 72 時間後では、雄で発現増加したものは 101 個、発現減少したものは 64 個、雌では発現増加したものは 141 個、発現減少したものは 114 個だった。</p> <p>インジェクション 24・72 時間後において最も発現増加ならびに発現減少した上位 10 遺伝子をそれぞれみると、遺伝子機能が明らかとなっていないものが多くを占めていた。このことから、雌雄で変動の大きな遺伝子の多くが機能不明であることが示された。</p> <p>雄 <i>A. stephensi</i> において <i>P. falciparum</i> のガメートサイトおよびザイゴートのインジェクション後 15 日目まで感染が確認された。さらに、ガメートサイトのインジェクション 1 日後と比べ 15 日後には <i>P. falciparum</i> の DNA 量が増加していた。これらのことから、雄 <i>A. stephensi</i> にガメートサイトまたはザイゴートのインジェクションにより形成されたオーシスト内でスポロゾイトが形成されている可能性が示された。</p> <p>本年度は来所できながったが、Web およびメールでのディスカッションを実施し、旅費に関する経費を研究課題遂行に必要な、試薬および研究用消耗品の購入に変更した。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>第 164 回日本獣医学会学術集会 (2021 年 9 月) 雌雄ハマダラカにおける <i>Plasmodium berghei</i> 感受性の比較 原口 麻子、鈴木 こなつ、高野 真、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、吉川 泰永、草木迫 浩大、筏井 宏実</p> <p>第 67 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同大会 (2021 年 10 月) 雄ハマダラカを用いた <i>Plasmodium falciparum</i> oocyst 形成の検討 原口 麻子、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、草木迫 浩大、筏井 宏実</p> <p>第 91 回日本寄生虫学会大会 (2022 年 5 月) <i>Plasmodium</i> 原虫発育に対する雌雄ハマダラカの分子機構解析 原口 麻子、高野 真、箱崎 純、中山 和彦、中村 咲蓮、吉川 泰永、草木迫 浩大、筏井 宏実</p>