

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022年5月12日

採択番号	2021-共同-6		
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	分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるフタトゲチマダニの胚発生に及ぼす影響		
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			
	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・准教授	
研究期間	2021年4月1日 ～ 2022年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニにとって必須の生存基盤は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大量の鉄がマダニ体内に放出される。鉄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鉄は卵の胚発生にも影響し、その鉄代謝の制御にはフェリチンが関与している可能性が考えられる。研究代表者らはその鉄代謝の制御を担う分子として、分泌型フェリチンに着目し、分泌型フェリチン遺伝子ノックダウンによるマダニの胚発生に及ぼす影響について、胚発生のステージごとに検証した。また、鉄イオン濃度を測定することによって、鉄イオン濃度の動態と胚形態の相互関係を明らかにした。</p>		
研究経過の概要	<p><b>【研究目的】</b> マダニによる感染症を制御するためには、マダニの生体機能を理解することが不可欠である。しかし、マダニ胚発生における FER などの抗酸化分子の発現動態については不明な点が多い。そこで本研究では、分泌型 FER (FER2) 遺伝子ノックダウンした発育胚について、各経過日の発育胚 (Day 1, Day 5, Day 10, Day 15, Day 20) に含まれる鉄イオン濃度の動態と (FER2) タンパク質の局在を調べることによって、胚発生における両者の機能を明らかにすることを目的とした。</p> <p><b>【材料と方法】</b> FER2 遺伝子ノックダウンしたフタトゲチマダニの発育胚について、Scale 法の手法に従い透明化を行った。透明化技術によって透明化したマダニの発育胚について、DAPI を用いて核染色をした後、蛍光顕微鏡で観察を行って、胚発生のステージを同定した。また、ノックダウンによって胚形態に及ぼす影響について観察した。さらに、Quantichrome™ iron assay kit を用いて、ホモジナイズした各経過日のノックダウンした発育胚 (Day 1, Day 5, Day 10, Day 15, Day 20) に含まれる二価鉄イオンならびに三価鉄イオンの濃度を測定した</p>		

<p>研究成果の概要</p>	<p><b>【結果】</b> <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群においても、発育胚における <i>FER2</i> 蛋白質の発現が観察され、対照群との間に、発現量や局在の違いは認められなかった。両群ともに、1 日目から 20 日目までの全経過日において胚細胞の細胞質内に <i>FER2</i> 蛋白質の蛍光が観察され、20 日目において、脚の中心部に強い蛍光が観察された。また、胚形態の観察およびステージ分類を行った結果、対照群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間で、胚形態やステージの割合に明らかな違いは認められなかった。さらに、全ての経過日において、<i>FER2</i> 遺伝子ノックダウンした胚に含まれる二価鉄イオンならびに三価鉄イオンの濃度に有意な差は認められなかった。</p> <p><b>【考察】</b> RNA 干渉法を用いて、フタゲチマダニの <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウンを行った場合であっても、雌成ダニに残存している <i>FER2</i> 蛋白質が、発育胚に移行することが考えられた。また、10 日目以降において、無処置群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間に <i>FER2</i> 蛋白質の発現量および局在に差は見られなかった。この結果から、<i>FER2</i> 遺伝子のノックダウンは、胚由来の <i>FER2</i> 遺伝子の発現に影響を及ぼさない可能性が考えられる。胚形態の観察およびステージ分類を行った結果、無処置群と <i>FER2</i> 遺伝子ノックダウン群の間に、胚形態やステージの割合に違いは認められず、孵化率についても差は認められなかった。以上の結果より、RNA 干渉法を用いた <i>FER2</i> 遺伝子のノックダウンは、雌成ダニの吸血および卵形成を阻害するが、胚発生には影響を及ぼさないことが示唆される。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p><b>【学会発表(予定)】</b>  島崎 慧, Emmanuel Pacia Hernandez, 新原博子, <u>白藤(梅宮)梨可</u>, 藤崎幸蔵, <u>田仲哲也</u>, フタゲチマダニ胚発生におけるフェリチンの発現動態, 第 91 回日本寄生虫学会, 帯広畜産大学, 2022 年 5 月(北海道)</p>