

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2023年6月7日

採択番号	2022-共同-8		
研究部門	診断治療研究部門	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	2022年4月1日 ~ 2023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こす時期である。</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>①オーカイネートの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マラリア原虫に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。②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。③雄蚊での発現変動が $fc \geq 10$ の 5 遺伝子のうち 3 遺伝子について、雌蚊の感染血吸血時と非感染血吸血時で遺伝子変動を比較したところ、雌蚊においてもそれら遺伝子発現に差がみられた。④加えて、オーカイネートの中腸細胞の通過および吸血血液がオーシスト分化にどのような影響を与えるかを検討した結果、オーカイネートによる中腸細胞の通過の有無はオーシストの大きさに影響せず、吸血血液はオーシスト形成(大きさ)に影響する因子が</p>		

	存在することが示された。
研究成果の概要	<p><i>P. berghei</i> のオーカイネートのインジェクション感染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た。オーシストの大きさを比較すると、インジェクション後 12 日目から 14 日目において雄蚊の方が雌蚊よりオーシスト径が大きかった。さらに、オーカイネートのインジェクション感染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、マウスへの感染が確認されスポロゾイトに感染性があることが示された。</p> <p>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。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った。さらに、雄蚊での発現変動が $fc \geq 10$ の 5 遺伝子のうち 3 遺伝子について、雌蚊の感染血吸血時と非感染血吸血時で遺伝子変動を比較したところ、雌蚊においてもそれら遺伝子発現に差がみられた。今後、これらの結果を基に、ハマダラカのマalaria原虫ベクターコンピテンシー制御因子の同定を目指し順次解析を行う予定である。</p> <p>加えて、オーカイネートの中腸細胞の通過および吸血血液がオーシスト分化にどのような影響を与えるかを検討した。すなわち、雌 <i>A. stephensi</i> に浣腸を行い、直接中腸内腔にオーカイネートを入れて感染させ、中腸細胞基底膜下にオーシストを形成させる感染方法を用いた(浣腸感染)。インジェクション感染群、浣腸感染群において形成されたオーシスト径を比較したところ、差はみられなかったことから、オーカイネートによる中腸細胞の通過の有無はオーシストの大きさに影響しないことが示された。次に、吸血血液の影響を比較するために、インジェクション感染および浣腸感染直後に非感染血を吸血させてオーシスト径を比較したところ、インジェクション感染では吸血の有無により大きさに差みられなかった。しかしながら、浣腸感染では吸血させた方のオーシスト径が明らかに大きくなった。このオーシスト径と感染マウスを吸血して形成された通常のオーシスト径とは差がみられなかった。このことから、吸血血液はオーシスト形成(大きさ)に影響する因子が存在することが示された。</p>
研究成果の発表	<p><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 第 91 回日本寄生虫学会大会(2022 年 5 月)</p> <p>Formation of free oocysts in <i>Anopheles</i> mosquitoes injected with <i>Plasmodium</i> ookinetes. Haraguchi, A., Takano, M., Hakozaiki, J., Nakayama, K., Nakamura, S., Yoshikawa, Y., Fukumoto, S., Kusakisako, K., Ikadai H. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> submitted</p>