

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390126

研究課題名（和文）トランスジェニック蚊を用いたマラリア原虫-唾液腺の相互作用の解明

研究課題名（英文）Elucidation of interaction between malaria parasites and salivary glands using transgenic mosquitoes

研究代表者

吉田 栄人（YOSHIDA SHIGETO）

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10296121

研究成果の概要（和文）：ハマダラカ唾液腺特異的プロモーターを用いて、唾液腺にワクチン抗原を発現させることに成功した。作製した遺伝子組換え蚊（TG）の口吻から組換えタンパクが放出される様子観察することに成功した。また、抗マラリア抗体を唾液成分として発現する TG を作製し、この蚊はマラリア原虫の伝播能が著しく阻害されることを証明した。

研究成果の概要（英文）：We have successfully expressed vaccine antigens in the salivary glands of anopheline mosquitoes using the salivary gland-specific promoter. We observed that the transgenic mosquitoes released saliva containing the vaccine antigen through their proboscis. We made another transgenic mosquito expressing anti-malaria antibody in the salivary glands. The transgenic mosquito strongly impaired malaria transmission from mosquito to host.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：寄生虫学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫（衛生動物含む）

キーワード：ハマダラカ、マラリア、トランスジェネシス、唾液腺、スポロゾイト

1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫の全ゲノム配列が明らかにされ、ノックアウト原虫の技術が確立された今日では、マラリア原虫の複雑な生活環を支える重要な分子が次々と明らかになってきた。さらに、この技術を用いて弱毒化生ワクチンの開発も夢では無いとの報告もある。一方、「何故ハマダラカだけがマラリア原虫の発育

を許すのか」という寄生適応性は謎に包まれており、これを解明するためにはハマダラカの遺伝子操作技術の確立が不可欠である。

2000年、Crisantiらのグループが世界に先駆けて GFP 遺伝子を導入した“光る”トランスジェニックハマダラカの作製に成功した。それ以来、応用昆虫学を駆使したハマダラカ

の遺伝子操作 (Genetic Manipulation: GM)、すなわちマラリア非媒介蚊の作製がマラリアベクターコントロールの新しい戦略として注目を集めており、WHO はマラリア感染症対策の重要な手段と位置づけ、積極的に研究開発支援を開始した。我々のグループは 2001 年より Crisanti との共同研究を開始し、現在では世界で 5 指に入る高度な GM ハマダラカ作製技術を駆使してマラリア非媒介蚊の創出およびハマダラカ-マラリア原虫の寄生適応性の解明を目指し、研究を行っている。

2. 研究の目的

ハマダラカ唾液腺はマラリア原虫のスポロゾイトが集積する重要な器官であり、吸血により唾液とともにマラリア原虫が宿主へ侵入するいわば蚊のステージのマラリア原虫の最終居住地である。しかし、マラリア原虫のライフサイクルの中でもその唾液腺侵入メカニズム、関与する分子については全く解明が進んでいない。一体、数万匹にも及ぶスポロゾイトが何時、何処に、どのようにして唾液腺に侵入していくのかという謎を独自に開発した唾液腺 GM ハマダラカ技術を駆使し解明する。さらに唾液腺-マラリア原虫間の相互作用の研究および、マラリア原虫を伝播しないハマダラカの作製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子組換え蚊の新しい利用法として、蚊の唾液腺にワクチン抗原タンパク質を発現させ、蚊が吸血する際に唾液とともに宿主にワクチンを送り込み抗体を獲得させる

“Flying vaccinator” とよばれる新しいワクチン投与方法の構想がある。我々は、ハマダラカ唾液腺特異的に機能するプロモーター pAAPP を同定し、唾液腺に外来遺伝子を発現させることにすでに成功している。今回、モデル実験としてこのプロモーターを利用し、リーシュマニアのワクチン候補抗原タンパク質として知られるサンショウバエの唾液タンパク質 (SP15) を唾液腺に発現する遺伝子組換えハマダラカを作製した。

(2) ハマダラカ吸血時における AAPP の動態を解析することを目的に、海洋性プランクトン (*Metridia longa*) 由来の分泌型ルシフェラーゼ (MetLuc) と AAPP の C 末端側に付加した融合タンパク質 (MetLuc-AAPP) を唾液腺に発現する遺伝子組換えハマダラカ (*Anopheles stephensi*) を作製した。

(3) 熱帯熱マラリア原虫の CSP タンパクに対するモノクローナル抗体 2A10 を発現するハイブリドーマ細胞から mRNA を抽出し、重鎖軽鎖可変領域をコードした cDNA をクローニングすることに成功した。

4. 研究成果

(1) ハマダラカには SP15 遺伝子を DsRed との融合タンパク質として発現するように導入したところ、導入した個体では SP15 が DsRed との融合タンパク質として発現し、雌唾液腺特異的に DsRed の蛍光が観察された。また口吻からは DsRed の蛍光が放出されているのが観察された。さらに、この遺伝子組換え蚊をマウスに頻回吸血させたところ、吸血マウス体内において SP15 タンパク質に対する抗体が産生されていることが確認された。これらのことから作製した遺伝子組換え蚊は唾液中にワクチン候補抗原を発現し、“Flying vaccinator” として機能することが示された。

(2) 唾液腺で発現した MetLuc-AAPP は MetLuc の基質特異的なルシフェラーゼ活性を有しており、コラーゲン結合能があることがわかった。この蚊をマウスに吸血させ、MetLuc の基質をマウスに投与したところ、蚊の刺咬部位で高い発光が確認された。さらに吸血後 50 分に基質を再投与したところ同じ場所で発光が見られ、MetLuc-AAPP は刺咬部位に留まっていることが分かった。この結果は、唾液タンパク AAPP の生理学的機能解明、蚊の吸血活動のモニターリングを可能にし、引いては唾液腺に侵入したスポロゾイトの挙動を解明する有用な手段となると期待される。

(3) モノクローナル抗体2A10を唾液成分として発現することに成功した。このトランスジェニック蚊はマラリア原虫の蚊からマウスへの伝播を著しく阻害した。熱帯熱マラリア原虫を完全に伝播しないトランスジェニック蚊の作製に一步前進した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Sumitani M, Kasashima K, Yamamoto DS, Yagi K, Yuda M, Matsuoka H, Yoshida S. :Reduction of malaria transmission by transgenic mosquitoes expressing an anti-sporozoite antibody in their salivary glands. *Insect Mol Biol.* 2012 (in press). 査読有
- ② Hayashi H, Kyushiki H, Nagano K, Sudo T, Iyori M, Matsuoka H, Yoshida S. : Identification of the active region responsible for the anti-thrombotic activity of anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito. *Platelets.* 2012 (in press). 査読有 DOI:10.1016/j.thromres.2011.09.015
- ③ Yamamoto DS, Sumitani M, Nagumo H, Yoshida S, Matsuoka H. : Induction of antisporezoite antibodies by biting of transgenic *Anopheles stephensi* delivering malarial antigen via blood feeding. *Insect Mol Biol.* 21: 223-33, 2012. 査読有 DOI:10.1111/j.1365-2583.2011.01128.x
- ④ Hayashia H, Kyushikia H, Naganoa K, Sudo T, Matsuoka H, Yoshida S. : Anopheline anti-platelet protein from a malaria vector mosquito has anti-thrombotic effects in vivo without compromising hemostasis. *Thromb Res.* 129:169-75, 2011. 査読有
- ⑤ Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Inoue Y, McMurray DN, Sakatani M. : Novel prophylactic vaccine using a prime-boost method and hemagglutinating virus of Japan-envelope against tuberculosis. *Clin Dev Immunol* 2011:1-11, 2011. 査読有 DOI:10.1155/2011/549281
- ⑥ Kita Y, Okada M, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Kishigami C, Nishimatsu S, Sekine Y, Takamori Y, McMurray DN, Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M. : Development of therapeutic and prophylactic vaccine against Tuberculosis using monkey and transgenic mice models. *Hum Vaccin* 7:108-114, 2011. 査読有 DOI:10.4161/hv.7.0.14563
- ⑦ Yoshida S, Nagumo H, Yokomine T, Araki H, Suzuki A, Matsuoka H. : Plasmodium berghei circumvents immune responses induced by merozoite surface protein 1- and apical membrane antigen 1-based vaccines *PLoS ONE* 5:e13727, 2010. 査読有
- ⑧ Mlambo G, Kumar N, Yoshida S. :Functional immunogenicity of baculovirus expressing Pfs25, a human malaria transmission blocking vaccine candidate antigen. *Vaccine* 28:7025-9, 2010. 査読有
- ⑨ Blagborough AM, Yoshida S, Sattabongkot J, Tsuboi T, Sinden RE. : Intranasal and intramuscular immunization with Baculovirus Dual Expression System-based Pvs25 vaccine substantially blocks Plasmodium vivax transmission. *Vaccine* 28:6014-20, 2010. 査読有
- ⑩ Yamamoto DS, Nagumo H, Yoshida S. : Flying Vaccinator; a transgenic mosquito delivers a Leishmania vaccine via blood feeding. *Insect Mol Biol* 13: 391-9, 2010. 査読有
- ⑪ Yoshida S, Araki H, Yokomine T. : Baculovirus-based nasal drop vaccine confers complete protection against

malaria by natural boosting of vaccine-induced antibodies in mice. *Infect Immun* 78:595-602, 2010. 査読有

- ⑫ Yoshida S, Kawasaki M, Hariguchi N, Hirota K, Matsumoto M. : A Baculovirus Dual Expression System-based malaria vaccine induces strong protection against *Plasmodium berghei* sporozoite challenge in mice. *Infect Immun* 77:1782-9, 2009. 査読有
- ⑬ Okada M, Kita Y, Nakajima T, Kanamaru N, Hashimoto S, Nagasawa T, Kaneda Y, Yoshida S, Nishida Y, Nakatani H, Takao K, Kishigami C, Inoue Y, Matsumoto M, McMurray DN, Dela Cruz EC, Tan EV, Abalos RM, Burgos JA, Saunderson P, Sakatani M. Novel prophylactic and therapeutic vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 27:3267-70, 2009. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- ① 伊従光洋、中谷大樹、稲垣勝也、山本大介、川崎昌則、郭敬卓、水腰真巳、後藤義博、松岡裕之、松本真、吉田栄人. バキュロウイルスベクターを用いた熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトワクチンの感染防御効果—組換え原虫によるマウスおよびサルモデル—, 第 82 回日本寄生虫学会, 2013 年 3 月 30 日, 東京医科歯科大学湯島キャンパス (東京)
- ② 吉田栄人. Vector-borne diseases 研究: ラボからフィールドへ—トランスジェニック蚊を用いたマラリア原虫—唾液腺相互作用の解明日本獣医寄生虫学会シンポジウム 2013 年 3 月 28 日, 東京大学駒場キャンパス (東京)
- ③ Iyori M, Nakaya H, Inagaki K, Yamamoto D, Kawasaki M, Kwak K, Mizukoshi M, Goto Y, Matsuoka H, Matsumoto M, Yoshida S. Protective efficacy of baculovirus dual expression system that displays the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in a murine infection model. *Keystone Symposia A8 Malaria*, 2013 年 1 月 22 日, GW Marriot (USA)
- ④ 中谷大樹、伊従光洋、吉田栄人. 非感染性ウイルスベクターを用いた熱帯熱マラリアワクチンの開発研究—組換えマラリア原虫を用いた Baculovirus Dual Expression System (BDES) の感染防御効果—第 68 回日本寄生虫学会・西日本支部大会, 2012 年 10 月 26 日, 奈良県文化会館 (奈良)
- ⑤ 緒方壮太、伊従光洋、吉田栄人. VSVG タンパクを用いたバキュロウイルスベクターとする熱帯熱マラリアワクチンの改良, 第 53 回日本熱帯医学会, 2012 年 9 月 5 日, とかちプラザ (北海道)
- ⑥ 伊従光洋、中谷大樹、山本大介、松岡裕之、稲垣勝也、松本真、吉田栄人. GP64 型バキュロウイルスベクターを用いた熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトワクチンの感染防御効果, 第 53 回日本熱帯医学会, 2012 年 9 月 5 日, とかちプラザ (北海道)
- ⑦ Yoshida S, Yamamoto D, Sumitani, M, Matsuoka H. Mosquito. Salivary glands as vaccine delivery target. XXIV International Congress of Entomology, 2012 年 8 月 21 日, Exco-Daegu Exhibition Hall (Korea)
- ⑧ 炭谷めぐみ、笠島克巳、八木啓太、山本大介、油田正夫、松岡裕之、吉田栄人. 抗マラリアスポロゾイト抗体を唾液腺で発現する遺伝子組換えハマダラカはマラリア伝播能を喪失する, 第 30 回北陸病害動物研究会 2012 年 6 月 30 日, 三国文化未来館ホール (福井)
- ⑨ 吉田栄人、伊従光洋、石井明、松岡裕之. ハマダラカ唾液タンパクに対する抗体価とマラリア感染—マラリア疫学調査の手法—第 64 回日本衛生動物学会 2012 年 3 月 30 日, 信州大学 (長野)
- ⑩ 吉田栄人、伊従光洋、坪井敬文、Sattabongkot J、Mlambo G、M. Blagborough A、Sinden R、Kumar N、バキュロウイルスベクターを用いた熱帯熱・三日熱マラリア伝播阻止ワクチンの開発研究, 第 81 回日本寄生虫学会 2012 年 3 月 30 日, 兵庫医科大学 (兵庫)
- ⑪ 山本大介、横峰隆志、八木馨太、松岡裕之、吉田栄人. 分泌型ルシフェラーゼ融合 AAPP タンパク質を発現する遺伝子組換えハマダラカ, 第 81 回日本寄生虫

学会 2012 年 3 月 30 日, 兵庫医科大学(兵庫)

- ⑫ 吉田栄人, 組換え蚊を用いたマラリア対策, 第 29 回北陸病害動物研究会, 2011 年 7 月 2 日, 金沢大学 (石川)
- ⑬ 横峰隆志、山本大介、南雲浩志、松岡裕之、吉田栄人, トランスジェニックハマダラカを用いた唾液中の AAPP-ルシフェラーゼ融合タンパクのバイオイメージング, 第 79 回日本寄生虫学会大会, 2011 年 7 月 2 日, 旭川コンベンションセンター (北海道)
- ⑭ 山本大介、南雲浩志、吉田栄人, ワクチン候補抗原を吸血時に媒介する遺伝子組換え蚊, 第 54 回日本応用動物昆虫学会, 2011 年 3 月 20 日, 千葉大学 (千葉)
- ⑮ Yamamoto D, Nagumo H, Yoshida S. Transgenic mosquito delivering a Leishmania vaccine antigen via blood feeding. 58th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2010 年 11 月 20 日, Washington Marriot (USA)
- ⑯ 山本大介、南雲浩志、吉田栄人: リーシュマニアワクチン候補タンパク質を唾液として分泌する遺伝子組換えハマダラカの解析, 第 50 回日本熱帯医学学会大会, 2009 年 11 月 21 日, 宜野湾コンベンションセンター (沖縄)
- ⑰ Yoshida S, Yamamoto D, Nagumo H. A Model for “Flying Vaccinator”: A transgenic anopheline mosquito delivers the leishmania vaccine antigen SP15 via blood feeding.. EMBO WORKSHOP 2009 “Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Diseases Vectors”, 2009 年 7 月 26 日, Orthodox Academy of Crete (ギリシャ)
- ⑱ 吉田栄人, 山本大介、南雲浩志, DsRed を唾液腺に発現するハマダラカの作製—マラリア原虫の唾液腺侵入メカニズム解明に向けての新規アプローチ—, 第 61 回日本衛生動物学会大会, 2009 年 4 月 3 日高松ホール (香川)

吉田 栄人 (YOSHIDA SHIGETO)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号 : 10296121

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

6. 研究組織
(1) 研究代表者