

氏名（本籍）	三 好 猛 晴（兵庫県）			
学 位 の 種 類	博士（獣医）			
学 位 記 番 号	獣医博乙第70号			
学位授与年月日	平成17年3月14日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
学 位 論 文 題 目	フタトゲチマダニ <i>Haemaphysalis longicornis</i> 新規セリンプロテアーゼの遺伝子クローニングと特性解明			
審 査 委 員	主査	帯広畜産大学	教 授	藤 崎 幸 蔵
	副査	帯広畜産大学	教 授	杉 本 千 尋
	副査	岩 手 大 学	教 授	安 田 準
	副査	東京農工大学	教 授	加茂前 秀 夫
	副査	岐 阜 大 学	教 授	福 士 秀 人

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究では、吸血性節足動物であるマダニの生体内において吸血行動に重要な役割を果たすと考えられるセリンプロテアーゼ遺伝子 *H1SP* をフタトゲチマダニ *H. longicornis* より分離し、中腸での宿主血液消化に関与することを明らかにし、特有の酵素活性について検討を加えた。さらに RNAi によって *H1SP* mRNA の発現抑制を試み、*H1SP* が同種の吸血行動に不可欠な役割を果たすことを示した。

第 I 章では、*H. longicornis* cDNA ライブラリーより、セリンプロテアーゼ様遺伝子 *H1SP* を分離した。*H1SP* の推定産物は 464 アミノ酸残基から構成され、エンドサイトーシスに関与するとされる CUB ドメイン、LDL receptor class A ドメインを含んでいることが示された。*H1SP* の推定アミノ酸配列は、コイタマダニ由来のセリンプロテアーゼと最も高い相同性を示すとともに、哺乳類のセリンプロテアーゼとも相同性を示した。セリンプロテアーゼの酵素活性に不可欠な 3 つのアミノ酸残基は *H1SP* において保存されていた。

第 II 章では、内在性 *H1SP* の発現と組織における局在について検討した。*H1SP* 蛋白質の酵素活性ドメインに相当する組換え体を作製し、マウスに免疫してポリクローナル抗体を得た。内在性 *H1SP* 蛋白質は、幼ダニ、若ダニ、成ダニの 3 発育期の抽出蛋白質から検出されたことから、同種の生活環を通じて不可欠な機能を持つ分子であると考えられた。また、内在性 *H1SP* は中腸上皮細胞で発現し、その発現量は吸血によって増強されることが明らかとなった。加えて、組換え *H1SP* は BSA を加水分解することが示され、宿主血液成分の消化に関与することが示唆された。

第 III 章では、組換え *H1SP* の酵素性状を検討した。組換え *H1SP* は、セリンプロテアーゼとしての基本的な基質特異性および阻害剤感受性を有していることが明らかにされた。また、組換え *H1SP* の至適活性は pH 4.0-5.0、25℃において確認された。また、*H1SP* の酵素活性は、

広い pH・温度領域で維持されており、マダニ独特の血液消化機構および生活環に関連して進化した特性であると推察された。

第IV章では RNAi の手法を用いて HISP 遺伝子発現を特異的に抑制することができた。HISP dsRNA を注入した成ダニは、吸血に伴う生育が阻害されており、内在性 HISP がマダニの吸血時に機能していることが明らかにされた。

本研究において *H. longicornis* より分離された HISP はマダニ中腸上皮細胞で発現し、マダニの吸血時に機能するセリンプロテアーゼであることが示された。本研究で得られた成績は、国内での被害が最も大きく、防除が困難な *H. longicornis* に対して、吸血および血液消化の阻止による新規の防除技術を開発する上で大いに貢献するとともに、マダニによる病原体媒介機構を明らかにするためにも有用な知見であると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構・動物衛生研究所・寄生虫病研究室において、外部寄生虫であるマダニに対して従来の化学的殺マダニ剤に頼らない新たな対処法の開発が極めて重要であると考え、わが国におけるマダニの最優占種であり、国内の被害が最も大きいフタトゲチマダニを取り上げ、これに対する新規の防除法を開発するために重要なマダニ特有のセリンプロテアーゼ分子を探索し、その性状と特性を明らかにすることを目的とした研究を実施した。

1. フタトゲチマダニの cDNA ライブラリーより、セリンプロテアーゼ様遺伝子 *HISP* を分離した。*HISP* 遺伝子の推定産物は 464 アミノ酸残基から構成され、分子量は 50 kDa、等電点 8.2 であると推定された。また、推定アミノ酸配列に基づいたドメイン解析により、*HISP* 蛋白質は哺乳類でエンドサイトーシスに関与するといわれるドメインを含んでいることが示された。*HISP* の推定アミノ酸配列は、他のマダニ種由来のセリンプロテアーゼとも高い相同性を示すとともに、哺乳類由来セリンプロテアーゼとも相同性を示した。セリンプロテアーゼの酵素活性に不可欠な 3 つのアミノ酸残基は *HISP* において保存されていた。

2. *HISP* 蛋白質の酵素活性ドメインに相当する分子量 31 kDa の組換え蛋白質を大腸菌にて作製し、*HISP* を認識するポリクローナル抗体を得た。フタトゲチマダニ抽出蛋白質を用いたイムノブロットによって、内在性 *HISP* 蛋白質は、幼ダニ、若ダニ、成ダニの 3 発育期の抽出蛋白質から検出されたことから、同種の生活環を通じて不可欠な機能を発揮する酵素であると推測された。また、免疫組織化学染色によって、内在性 *HISP* は中腸上皮細胞で発現していることが示され、その発現は吸血によって増強されることが明らかとなった。加えて、組換え *HISP* は BSA を加水分解することが示された。これらの結果から、内在性 *HISP* はフタトゲチマダニ中腸の血液消化に関与することが強く示唆された。

3.組換え HISP と各種酵素特異的基質、酵素阻害剤を用いた評価実験により、HISP はセリンプロテアーゼとしての典型的な基質特異性ならびに阻害剤感受性を備えていることが明らかとなった。また、組換え HISP の至適 pH は 4.0-5.0 であり、至適温度は 25℃であったことから、HISP の酵素活性は、広い pH および温度領域で示され、またマダニ独特の消化機構や生活環と関連して進化した特徴であると推測された。

4. *HISP* dsRNA をマイクロインジェクションによってフタトゲチマダニ雌成ダニ血体腔に注入し、RNA 干渉によって *HISP* mRNA の発現を特異的に抑制することができた。*HISP* dsRNA を注入した成ダニは、吸血に伴う生育が阻害されており、これらの結果から、内在性 HISP が正常な吸血行動の維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

以上の結果より、本研究においてフタトゲチマダニから新規に分離された HISP は、同種の中腸上皮細胞に発現し、宿主血液成分の消化に関与するとともに、マダニの吸血生理および生活環に関連した独特の性状を有するセリンプロテアーゼであると考えられた。本研究で得られた成績は、吸血や病原性原虫の媒介による被害が国内で最も大きく、防除が困難なフタトゲチマダニに対して、吸血あるいは血液消化の阻止による新規防除技術の開発に大いに貢献するとともに、マダニによる病原体媒介機構を明らかにするためにも有用であると考えられた。

以上について、審査員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 Cloning and molecular characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*  
著 者 名 Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Kamio, T. and Fujisaki, K.  
学術雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology  
巻・号・頁・発行年: 34 (8): 799-808, 2004
- 2) 題 目 Enzymatic characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*  
著 書 名 Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Kamio, T. and Fujisaki, K.  
学術雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年: 66 (10): 1195-1198, 2004
- 3) 題 目 Gene silencing of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* by RNA interference  
著 者 名 Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Kamio, T. and Fujisaki, K.  
学術雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年: 66 (11): 1471-1473, 2004

- 1) 題 目 Immunohistochemical study on peptidergic neurons containing FMRFamide in the stomatogastric nervous system of the American cockroach.  
著 者 名 Miyoshi, T. and Endo, Y.  
学術雑誌名 Applied Entomology and Zoology  
巻・号・頁・発行年: 33 (1): 133-138, 1998
  
- 2) 題 目 *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Frankliniopsis vespiformis* (Thysanoptera: Insecta)  
著 者 名 Arakaki, N., Miyoshi, T. and Noda, H.  
学術雑誌名 Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences  
巻・号・頁・発行年: 268 (1471): 1011-1016, 2001
  
- 3) 題 目 *Wolbachia* infection shared among planthoppers (Homoptera: Delphacidae) and their endoparasite (Strepsiptera: Elenchidae): a probable case of interspecies transmission  
著 者 名 Noda, H., Miyoshi, T., Zhang, Q., Watanabe, K., Deng, K. and Hoshizaki, S.  
学術雑誌名 Molecular Ecology  
巻・号・頁・発行年: 10 (8): 2101-2106, 2001
  
- 4) 題 目 In vitro cultivation of *Wolbachia* in insect and mammalian cell lines.  
著 者 名 Noda, H., Miyoshi, T. and Koizumi, Y.  
学術雑誌名 In vitro Cellular and Developmental Biology. Animal.  
巻・号・頁・発行年: 38 (7): 423-427, 2002
  
- 5) 題 目 Lung-stage protein profile and antigenic relationship between *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*  
著 者 名 Wossene, A., Tsuji, N., Kasuga-Aoki, H., Miyoshi, T., Isobe, T., Arakawa, T., Matsumoto, Y. and Yoshihara, S.  
学術雑誌名 Journal of Parasitology  
巻・号・頁・発行年: 88 (4): 826-828, 2002
  
- 6) 題 目 Species-specific proteins identified in *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* using two-dimensional electrophoresis  
著 者 名 Wossene, A., Tsuji, N., Kasuga-Aoki, H., Miyoshi, T., Isobe, T., Arakawa, T., Matsumoto, Y. and Yoshihara, S.  
学術雑誌名 Parasitology Research  
巻・号・頁・発行年: 88 (9): 868-871, 2002
  
- 7) 題 目 Inorganic pyrophosphatase in the roundworm *Ascaris* and its role in the development and molting process of the larval stage parasites  
著 者 名 Islam, M.K., Miyoshi, T., Kasuga-Aoki, H., Isobe, T., Arakawa, T., Matsumoto, Y. and Tsuji, N.  
学術雑誌名 European Journal of Biochemistry  
巻・号・頁・発行年: 270 (13): 2814-2826, 2003
  
- 8) 題 目 Temperature and metal ions-dependent activity of the family I inorganic pyrophosphatase from the swine roundworm *Ascaris suum*  
著 者 名 Islam, M.K., Miyoshi, T., Isobe, T., Kasuga-Aoki, H., Arakawa, T., Matsumoto, Y., Yokomizo, Y. and Tsuji, N.  
学術雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年: 66 (2): 221-223, 2004

- 9) 題 目 The proteome expression patterns in adult *Ascaris suum* under exposure to aerobic/anaerobic environments analyzed by two-dimensional electrophoresis  
著 者 名 Islam, M.K., Miyoshi, T., Yokomizo, Y. and Tsuji, N.  
学術雑誌名 Parasitology Research  
巻・号・頁・発行年: 93 (2) :96-101, 2004
- 10) 題 目 Recombinant *Ascaris* 16-Kilodalton protein-induced protection against *Ascaris suum* larval migration after intranasal vaccination in pigs  
著 者 名 Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M.K., Isobe, T., Yoshihara, S., Arakawa, T., Matsumoto, Y. and Yokomizo, Y.  
学術雑誌名 The Journal of Infectious Diseases  
巻・号・頁・発行年: 190 (10) :1812-1820, 2004